

Pin1の精子幹細胞および間葉系幹細胞の分化増殖制御機能の解明

著者	鈴木 充子
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第18340号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00123852

Pin1 の精子幹細胞および間葉系幹細胞の 分化増殖制御機能の解明

鈴木 充子

目次

凡例

序論

第1章 精子幹細胞における Pin1 の重要性の解明

第1節 緒言

第2節 実験方法

2-1 動物

2-2 遺伝子型解析

2-3 免疫染色法

2-4 蛍光免疫染色法

2-5 ホールマウント法

第3節 結果

第4節 考察

第2章 天然物由来褐藻類ポリフェノールによる Pin1 阻害

第1節 緒言

第2節 実験方法

2-1 動物

2-2 細胞培養

2-3 脂肪細胞分化誘導

2-4 Oil Red O による脂肪滴の染色

2-5 ウエスタンブロッティング法

2-6 レトロウイルスによる *NICD* 遺伝子導入

第3節 結果

第4節 考察

総合考察

謝辞

公表論文

参考文献

凡例

本論文で用いた略語を以下に示す。

2-ME	2-mercaptoethanol
APS	Ammonium PeroxodiSulphate
ASCs	Adipose-derived mesenchymal stem cells
AW	Autoclaved water
BPB	Bromophenol blue
BSA	Bovine serum albumin
CBB	coomassie brilliant blue
cDNA	complementary DNA
C/EBP α	CCAAT-enhancer-binding protein α
DDW	deionized distilled water
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	Fetal bovine serum
GFR α 1	glial cell derived neurotrophic factor family receptor α 1
GLUT4	Glucose <i>transporter</i> type 4
GST	Glutathione S-transferase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IgG	Immunoglobulin G
IRS-1	insulin receptor substrate-1
KO	knockout
LB	Luria Bertani
LPL	lipoprotein lipase
mRNA	messenger RNA
PAGE	Poly acrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEI	Polyethylenimine
PFA	paraformaldehyde
PLZF	promyelocytic leukaemia zinc finger protein
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ

PPIase	Peptidylprolylisomerase
PVDF	PolyVinylidene DiFluoride
qPCR	Quantitative PCR
RNA	ribonucleic acid
RT	reverse transcription
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SPF	specific pathogen free
SSCs	spermatogonial stem cells
TBE	Tris-borate-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TBS-T	Tris Buffered Saline with Tween 20
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl ethylenediamide
Tris	Tris (hydroxymetyl) aminomethane
Tween20	Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate
WT	wild type

その他核酸塩基類、アミノ酸、一般化学物質等は通例に従った。

本研究で用いた試薬類は特に断りのない限り一般試薬としてナカライテスク（株）と和光純薬工業（株）の試薬特級を用いた。試薬を調製する際には、蒸留水を用い、適宜 MilliQ 水、または 121°C, 20 分間オートクレーブ滅菌処理を行った滅菌水を用いた。

序論

多くの酵素は生体内で作り出されるタンパク質を基にして構成されており、細胞内で起こるさまざまな化学反応に多種の酵素がはたらいている。調節酵素の一つであり、他のタンパク質の構造変換を触媒することで活性調節を担っている酵素に Pin1 がある。Pin1 は細胞周期調節因子として発見され、分子量は約 18 kDa、163 アミノ酸からなるタンパク質で、基質を認識する WW ドメインと異性化反応を行う PPIase ドメインという 2 つのドメインから構成される。タンパク質のリン酸化された Ser/Thr とそれに続く Pro 配列を認識しペプチド結合の *cis-trans* 異性化を触媒することで[1,2]、リン酸化タンパク質の立体構造を制御しているプロリン異性化酵素(Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase:PPIase)の一種である[3]。また Pin1 と結合する分子として p-53,c-Myc,Jun/Fos などの転写因子調節タンパクがあり[4-8]、Pin1 はそれらの活性調節を行っている。

タンパク質のリン酸化は生体の中で大きな役割を担う翻訳後修飾である。酵素の活性調節、シグナル伝達や細胞周期など多くの生命現象が、リン酸化をトリガーとして起こる。リン酸化がタンパク質の構造に変化をもたらし、その変化が機能を調節していると考えられ、すなわちタンパク質の『リン酸化』と『構造変化』は非常に密接な関係にある。

Pin1 はリン酸化したタンパク質に作用しペプチド結合を異性化する。つまり特異的にリン酸化タンパク質の構造を積極的に変化させると考えられ、リン酸化シグナル伝達経路を調節することがわかってきた。実際 Pin1 タンパク質の細胞内での発現量の変化が、細胞分裂、細胞分化の異常につながり細胞のガン化を誘導することがわかっている。

例えば、アルツハイマー病の原因の一つであるタウタンパク質にも Pin1 が関係している[9]。Pin1 はタウタンパク質の構造変換を促進することでタウの脱リン酸化を促し、過剰リン酸化を防いでいる。この作用は、過剰リン酸化タウタンパク質の凝集が引き金となる神経変性疾患を防いでいる[10]。

本研究室では、Pin1 を欠損したノックアウトマウスを作製し[2]、マウスの健康・寿命・組織に現れる Pin1 欠損の影響を調べ、調節酵素・Pin1 の個体での機能を明らかにしようとしてきた。Pin1 の欠損によっても生育可能であるが、多岐にわたり分化異常が確認されている[1]。しかし様々な制御経路がありそのメカニズムの詳細はわかっていない。

Cyclophilin や Par14 などの代替の分子の存在も示唆されている [11,12]。さらに、4 つの転写因子、通称山中因子 (Oct3/4,Sox2,Klf-4,s-Myc) の形質導入による線維芽細胞の人工多能性幹(iPS)細胞の安定性と分化の効率が悪かったが、Pin1 を共発現させることで、飛躍的に

iPS 細胞の樹立の効果を上げるという報告もある[13]。このように幹細胞の分化制御を担う分子基盤の獲得が期待されている今、Pin1 が幹細胞にどのように関わっているのか解明することはとても有益な研究であると考えている。

そこで本研究では、Pin1 欠損マウスの表現型として特に顕著に現れる精巣の萎縮と、脂肪蓄積の減少に着目し、その制御経路を解明することを目的とした。Pin1 は Oct4、Nanog、Sox2 など幹細胞性の維持に関わる因子、さらに PPAR γ 、IRS-1 など脂肪細胞への分化に関する因子に作用することが分かっているが、精子幹細胞での Pin1 の機能や脂肪細胞に分化する間葉系幹細胞における Pin1 の分子機構は未だ解明されていないことが多い分野である。Pin1 欠損の影響を著しく受けている両者幹細胞において、Pin1 の機能に共通性を見出すことにより、将来より安全に Pin1 を阻害することによる不妊薬への応用や、肥満治療への応用につながることを期待する。

第1章 精子幹細胞における Pin1 の重要性の解明

第1節 緒言

細胞の増殖・分化にはシグナル伝達が関与している。Pin1 欠損動物は死に至ることはないが、様々な障害を引き起こすことは報告されている[5,10,14]。その中でも最も顕著なものの一つに不妊がある。表現型としては、Pin1 欠損マウスでは雄の著しい精巣萎縮が確認されている[14]。

精原細胞は有糸分裂を繰り返し、「未分化型精原細胞」と「分化型精原細胞」に分類される。未分化型精原細胞がシングルで存在していると As と呼ばれ、それが架橋を作りつながることにより 2 個は Apr、4 個は Aal-4、8 個は Aal-8、16 個は Aal-16 と呼ばれている[15,16]。これらの細胞には、GDNF (glial cell derived neurotrophic factor)が発現しており、主に As と Apr に強発現していてこれらを精子幹細胞と分類している[17]。GFR α 1 (glial cell derived neurotrophic factor family receptor α 1) はこの GDNF のレセプターであり、抗 GFR α 1 抗体は精子幹細胞を検出できる抗体として使われている。この抗 GFR α 1 抗体陽性細胞は、自分と同じ細胞を作り出す「自己複製能」を持つ幹細胞・Spermatogonial stem cells (SSCs) であり、in vivo で生涯維持されている[18-24]。SSCs は自己複製と分化のバランスを保ちながら分裂増殖しており、機能する細胞へと分化する「分化能」を有する細胞へ分化した場合、GFR α 1 の発現は消えてしまい前駆細胞と呼ばれるようになる[18-22]。そして何度かの有糸分裂を繰り返し、減数分裂を行い精子へと成熟していくのが精子形成過程である[16]。

過去に、当研究室で作製した Pin1 欠損マウスの精巣を用い、GCNA1(Germ cell nuclear antigen)を免疫染色した結果から、精原細胞の減少が精巣の萎縮をもたらしたという報告がされた[25]。しかしながら、この GCNA1 は全ての精原細胞に発現しており、広い範囲での生殖細胞マーカーであったことから精子幹細胞 (SSCs) に言及することもできなかった。また、加齢の Pin1 欠損マウス精巣において、精細管内で異常な精子形成が観察されている。このように Pin1 欠損マウスは、精細胞の減少と精細管の空洞化が観察されており、Pin1 欠損による不妊を引き起こしていることは報告されているが、精子形成過程のどの段階の細胞で異常が起こっているのかその分子メカニズムは不透明な点が多い。

そこで第1章では、精子形成過程の分子基盤解明を目指し、その為にまず未分化型精原細胞に着目し、精子幹細胞と前駆細胞での Pin1 の分子機構を明らかにすることを目的とした。Pin1 は G1/S 期や G2/M 期の細胞周期を制御している分子であるともいわれているの

で[2, 26-29]、精巣内でも SSCs の細胞周期に関与し、精巣萎縮をもたらすという仮説をたてた。本章では、*in vivo* において、Pin1 は SSCs の有糸分裂を促進し、細胞分化促進に関与している結果を得たので報告する。

第2節 実験方法

2-1.動物

C57BL/6j バックグラウンドの Pin1 欠損(*Pin1*^{-/-})マウスは Fujimori らによって作製され[2]、本研究ではこのマウスを使用し実験を行った。東北大学農学部動物棟にて SPF 環境の下飼育された。表現型は、遺伝子解析を行い決定した。マウスを使った実験は東北大学における「動物実験規定」に従い、管理・実験を行った。

2-2.遺伝子型解析

マウス尻尾を 2mm 切断し、Puregene core kit A (QIAGEN) を用いてゲノム DNA を抽出し以下の条件で PCR を行った。


•PCR 溶液の調整

Genome DNA	0.75 µL
10×Blend Taq Buffer (東洋紡)	1.5 µL
dNTP mixture (東洋紡)	1.5 µL
AW	10 µL
10 µM primer1 (W1.2A_HA2)	0.5 µL
10 µM primer2 (1.2L_HA)	0.3 µL
10 µM primer3 (start2A_HA2)	0.3 µL
<u>Blend Taq (東洋紡)</u>	<u>0.15 µL</u>
Total	20 µl

•プライマー (fujimori et al.,1999 をもとに本研究室秋山により改良)

W1.2A_HA2	5'-CAT GAG AAG GGA TTA GAA GCA AGA TTC GAC TGG-3'
Start2A_HA2	5'-GCC AGA GGC CAC TTG TGT AGC GC-3'
1.2L_HA	5'-GCA CCC GAT CCT GTT CTG CAA ACT CAG-3'

•PCR 条件

94°C	10 min		35 cycles
94°C	1 min		
58°C	1.5 min		
72°C	1.5 min		
4°C	forever		

PCR 後、アガロース電気泳動を行った。その後、エチジウムブロマイド溶液にて 30 分間染色を行い、LAS 3000 (FUJIFILM)で検出した。バンドの位置によって遺伝子型を決定した。

2-3.免疫染色方法

•パラフィン包埋ブロック作製法

精巢を摘出後、PBS でリンスし 4%PFA(WAKO)に浸し 4°Cで一晩固定した。

70%エタノール	一晩
80%エタノール	30分
90%エタノール	一晩
99.5%エタノール	90分
99.5%エタノール	90分
キシレン	60分
キシレン	60分
パラフィン	60分
パラフィン	60分
パラフィン	包埋

•脱パラ

キシレン	10分
キシレン	10分
キシレン	10分
99.5%エタノール	2分
99.5%エタノール	2分
99.5%エタノール	2分
90%エタノール	2分
70%エタノール	2分

•脱水

70%エタノール	2分
80%エタノール	2分
99.5%エタノール	2分
99.5%エタノール	2分
99.5%エタノール	2分
キシレン	2分
キシレン	2分
キシレン	2分

•10x Citrate buffer stock pH6.0

Citric Acid, anhydrous 3.54g

Trisodium Citrate Dihydrate (Sodium Citrate) 24.1g / L

•抗原抗体反応

YAMATO RV-240 を用いて 5 μ m のパラフィン切片を作製し、MAS コートされているスライドガラスにのせ（松波）、40°Cで一晩伸展（Tissue-Tek）させた。また必要に応じて PAS

染色には連続切片を用意した。まず脱パラした後、マイクロウェーブ法（クエン酸溶液に浸し 10 分間マイクロウェーブをあてた後、40 分間クールダウン）またはヒスト VT ワン（ナカライテスク）を用いて賦活化を行った。10 分間×3 回 TBS 洗浄した後、内因性パーオキシダーゼ除去の目的で 0.3%過酸化水素水の入ったメタノールに 20 分間浸した。10 分間×3 回 TBS 洗浄した後、ウマ血清で常温下 30 分間ブロッキングを行った。次に一次抗体、anti-GFR α 1 Ab (1:800, Neuromics), anti-PLZF Ab (1:200, Santa cruz)をそれぞれ 4°Cで一晩反応させた。10 分間×3 回 TBS-T 洗浄した後、ビオチン化二次抗体で常温下 1 時間反応させた。10 分間×3 回 TBS-T 洗浄した後、ABC 試薬 (VECTOR Laboratories) で常温下 30 分間反応させた。10 分間×3 回 TBS-T 洗浄した後、3,3-Diaminobenzidine, tetrahydrochloride (DAB, DOJINDO) 溶液 (in 0.1M Tris-HCl including 0.05% H₂O₂)で常温下 10 分間反応させた。反応は水で停止し、脱水行程を行いマリノール (MUTO) で封入した。

•解析方法

陽性細胞数や精細管断面周囲長の計測は、顕微鏡 (OLYMPUS) にモニター BT FHRm (Mio Tools Inc.)を取り付け行った。約 30 個の精細管断面をランダムに選び、総陽性細胞数を総精細管断面周囲長で割り、周囲長あたりの陽性細胞数として平均を算出した。

2-4.蛍光免疫染色法

組織固定、パラフィン包埋ブロック作製、切片作製、脱パラは免疫染色法と同様に行った後、ウマ血清で常温下 30 分間ブロッキングを行った。その後、一次抗体 anti-GFR α 1 Ab (1:800, Neuromics)または anti-phospho-HistoneH3 Ab (1:200, Millipore Marker)を 4°Cで一晩反応させた。10 分間×3 回 TBS-T 洗浄した後、蛍光ラベルされた二次抗体希釈溶液に核染色をする Hoechst 33342 (1:5000, Millipore) 抗体も混合して常温下で 1 時間反応させた。10 分間×3 回 TBS-T 洗浄した後、Slow fade diamond (Thermo Fisher)を切片に 1 滴落としてカバーガラスをしてマニキュアで封印した。観察は BX63 (OYMPUS)顕微鏡で行い、陽性反応を示す未分化型精原幹細胞の判断は、核の存在も確認しながら 60 倍率で観察した。

2-5.ホールマウント法

マウスから精巣を取り出した後、実体顕微鏡下で精巣内より精細管を取り出す。精細管を十分にほぐし 4% PFA で一晩固定した。4°C下で 5 分間×2 回 TBS-T 洗浄した後、MAS コートされたスライドガラスに精細管を 1 本ずつ貼り付けていった。次に脱水/水化を行った

後、ブロッキングを Blocking reagent (PerkinElmer) を用い常温下で 1 時間行った。一次抗体 anti-GFR α 1 Ab (1:800 dilution; R&D Systems) を 4°C 下で一晩反応させた。10 分間×3 回 TBS-T で洗浄した後、蛍光ラベルした二次抗体と Hoechst 33342 (1:5000, Millipore) を常温下で 1 時間反応させた。10 分間×3 回 TBS-T で洗浄した後、Slow fade diamond (Thermo Fisher) を切片に 1 滴落としてカバーガラスをしてマニキュアで封印した。退色する前に顕微鏡 BX63 (OYMPUS) 下で観察した。

•脱水/水化 (4°C 下で行う)

25% MeOH-TBST	7分
50% MeOH-TBST	7分
75% MeOH-TBST	7分
100% MeOH-TBST	7分
75% MeOH-TBST	7分
50% MeOH-TBST	7分
25% MeOH-TBST	7分

第3節 結果

精巣の形態観察を示した (Fig.1A)。図は 38 週齢の精巣であり、野生型 (WT) と Pin1 ノックアウト (KO) では大きさに顕著な差が見られた。この詳細を調べる為に経時的に精巣重量を測定した (Fig.1B)。その結果、16 週齢までは両者に差が見られなかったが、加齢につれて WT の精巣重量に変化は見られないのに対し、KO では 16-38 週齢にかけて極端に減少し、その後も緩やかに減少していくことが明らかとなった。

未分化型精原細胞は抗 PLZF (Promyelocytic leukaemia zinc finger protein) 抗体により検出できる [30,31]。免疫染色により KO 精巣内では、加齢に伴い退化していくような異常な精細管の空洞化が観察され、92 週齢には精細胞は完全に枯渇していたのがわかった。また、抗 PLZF 抗体陽性細胞は存在しないが、セルトリ細胞は確認できた (Fig.2A)。生存する精細管内の抗 PLZF 抗体陽性細胞の数を調べた結果、WT と比較して KO では明らかに減少していたが、16-38 週齢ではその陽性細胞数は変化せず、38 週齢後から徐々に減少していくグラフパターンは両者同じ形であった (Fig.2B)。つまり、WT と比べ KO の未分化型精原細胞の数は顕著に少ないが、その細胞が加齢に伴い減少するタイミングは同じであったことが示された。精巣断面に多数並んでいる精細管断面に一つ以上の抗 PLZF 抗体陽性細胞が存在する割合を計測した結果、KO 精巣内では WT の半分以下の割合でしか抗 PLZF 抗体陽性細胞が存在しないことが明らかとなった (Fig.2C)。

未分化型精原細胞であり抗 GFR α 1 抗体陽性細胞は、精子幹細胞と呼ばれている [24]。この細胞数は生涯変化しないと考えられているが [19,20]、KO マウスでは 34-38 週齢までは野生型より多い傾向にあり、その後 92 週齢までには著しく減少した (Fig.3A)。KO マウスでも抗 GFR α 1 抗体陽性細胞である As や Apr の数に WT と比べ大きな差はなかった (Fig.3Ba,b)。しかしながら、いくつかの精細管では、肥大化した異常な形態を示す GFR α 1 抗体陽性細胞が観察された (Fig.3Bc-e)。また、抗 phospho histone H3 抗体を用い、幹細胞が細胞周期の M 期である割合を調べた結果、抗 GFR α 1 抗体陽性でかつ抗 phospho histone H3 抗体陽性の細胞の割合は、WT マウス 16% に対し、KO マウスでは 32% であった (Fig.3C)。

第4節 考察

精子形成過程に不可欠な因子の欠損は精巣の萎縮を引き起こす[32]。Pin1 欠損においても精巣萎縮が報告されているが、どの段階で欠損の影響を受けているのか詳細は明らかではない。その要因は初期の精細胞、特に SSCs に Pin1 が作用していると予測し実験を行った。WT と KO マウスの精巣を比較することにより in vivo での未分化型精原細胞の発現型の詳細を調べその詳細を明らかとした。

抗 PLZF 抗体陽性細胞とは、精子幹細胞である SSCs と前駆細胞である progenitor cells が含まれる。Pin1 欠損マウスではこの抗 PLZF 抗体陽性細胞の数が著しく減少し、最終的にこの未分化型精原細胞は枯渇し、セルトリ細胞のみ存在する空洞化した精細管が観察された。これらの結果は、Pin1 欠損マウス精巣の精細胞は加齢により減少し、14 か月までに完全に消滅するという先行論文と一致した[25]。但し、これら先行論文で使われた抗 GCNA1 抗体は、生殖細胞マーカーであり広範囲の精子形成過程に存在する精細胞を認識していた。そこで本研究では、先に述べた抗 PLZF 抗体とさらに SSCs のみを認識する抗 GFR α -1 抗体という、細胞を特異的に認識識別できる 2 種類の抗体を用い免疫染色を行うことで、さらに Pin1 欠損による精巣萎縮の詳細を明らかにした。抗 GFR α -1 抗体は As や Apr と呼ばれる SSCs のみを識別できる抗体であり、この抗体陽性細胞数は、38 週齢まで WT より KO の方が多い傾向にあった。その後、徐々に数は減少していき、92 週齢までに完全に枯渇した。この両者抗体による免疫染色の結果、Pin1 欠損マウス精巣の萎縮は、前駆細胞(GFR α 1-陰性/PLZF-陽性)数の減少によるものであることがわかった。つまり Pin1 は、繁殖可能期間において前駆細胞(GFR α 1-陰性/PLZF-陽性)の分化を促進している可能性が示唆された。

また、野生型の精細管断面に一つ以上の抗 PLZF 抗体陽性細胞が存在する割合は 90%に 対し、KO 精巣内では半分以下の割合でしか抗 PLZF 抗体陽性細胞が存在しないという結果は、16-38 週齢マウス精巣重量の顕著な減少につながっていると考えた。

さらに、KO マウスでは抗 GFR α 1 抗体陽性細胞である SSCs が M 期である細胞の数は WT より高い割合であることから、細胞周期調整因子である Pin1 欠損により M 期が一定と仮定した場合、細胞周期の遅延が引き起され、有糸分裂期細胞の蓄積をもたらしたと考えた。これはアチソンらによって、雌雄生殖細胞ができる前の始原生殖細胞において、Pin1 欠損マウスでは DNA 合成の減少結果から細胞周期の遅延が報告されており[33]、今回の実験結果を強調させるものである。

また、異常に肥大化した精子幹細胞が確認され、抗ホスホヒストン H3 抗体は陰性であった。Pin1 欠損の影響は、幹細胞の自己複製抑制におけるものだけでなく、幹細胞の細胞形質が変化している可能性が示唆された。

結論として、Pin1 は SSCs において有糸分裂の促進や細胞分化の促進を制御し、精子幹細胞の自己複製と分化の維持に関与しているのではないかという実験結果を得ることができた。

精原細胞に特異的に発現し、欠損により精子形成が停止してしまう因子は多くはない [34,35]。Pin1 とそれら既知の分子との結合や修飾、または新しい分子同定、Pin1 はどのような分子間相互メカニズムで精巣内の恒常性維持に関与しているのか解明されることを期待している。

第2章 天然物由来褐藻類ポリフェノールによる Pin1 阻害

第1節 緒言

Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase (PPIase)の一種である Pin1 はリン酸化した Ser/Thr-Pro を認識しペプチド結合の cis/trans 異性化を触媒し、リン酸化タンパク質の立体構造を制御している。このようなメカニズムで Pin1 は細胞増殖、細胞分化、アポトーシスなど、重要な生命現象に関与する蛋白質を制御していることから、創薬ターゲットとしても注目されてきた。その中でも、肥満や糖尿病に Pin1 が関与している報告があり、Pin1 の発現は、高脂肪食給餌によって増加する[36-40]。

一方で健康志向が高まっている近年で注目されている、食品成分であるポリフェノール類は、肥満や癌といった加齢疾患に有効であり、その効果は Pin1 の持つ生理機能と共通点が多い。本研究室では、天然物より Pin1 の活性を抑制する化合物に着眼し、Pin1 阻害剤となる化合物のスクリーニングを行った。そして、海藻成分より Pin1 阻害活性を持つポリフェノールである 974-B を見出し[41]、NIH3T3-L1 細胞を用いた添加試験の結果、脂肪分化を抑制していることを確認している[42-44]。

そこで本研究第2章では、Pin1 欠損マウスは脂肪蓄積量が少ないことと、近年注目されているポリフェノールの作用が類似していることから健康食品としての利用をめざし、Pin1 阻害剤として天然物から抽出した褐藻類ポリフェノールを投与した動物実験を行った。クロメという天然物の海藻から長瀬産業によって crude な褐藻類ポリフェノールとして抽出された粉末を用い、その褐藻類ポリフェノールをマウスに経口投与し、生体内での Pin1 阻害剤としての効用を調べた。さらに、分子相互作用の解明を目標に、Pin1 欠損マウスの脂肪由来間葉系幹細胞株(ASC)を用い脂肪細胞分化誘導を行い、分子生物学的実験を行った。

今後も、脂肪細胞分化において Pin1 を介した分子基盤の解析を進めていくことを課題としている。

第2節 実験方法

2-1.動物

①動物

C57BL6j 雄の3週齢マウスは SLC Inc (浜松) より購入し、自由給餌とし東北大学農学部動物棟にて SPF 環境の下飼育された。1週間慣らし飼育をした後、実験は4週齢から始め、4つのグループ毎給餌条件を変え同条件で飼育し、8週間一日おきに体重測定を行った。普通食給餌群を対照区として高脂肪食給餌群、さらに高脂肪食給餌かつ水の経口投与群を対照区とし褐藻類ポリフェノールを経口投与群で比較した。

マウスを使った実験は東北大学における「動物実験規定」に従い、管理・実験を行った。

②餌

普通食(ND)マウス MF(オリエンタル酵母)

高脂肪食(HF) マウス HFD-60 (オリエンタル酵母)

③経口投与

褐藻類ポリフェノール(長瀬産業より crude なものを提供) 10 μ M/day

2-2.細胞培養

①ASC

ASC は、本研究室小峰・阿部によって樹立された *p53* ノックアウトマウス由来クローン性 ASC 株細胞 (Pin1 WT ASC) の#5 株および *p53/Pin1* ダブルノックアウトマウス由来クローン性 ASC 株細胞 (Pin1 KO ASC)の#j 株を使用した[45]。これらの ASC は、がん抑制遺伝子 *p53* を欠損したマウスから採取しており、高増殖能を維持したまま継代することができる。また ASC が分化できる細胞は多岐にわたり、由来である脂肪や骨、軟骨をはじめとして、グリア細胞や肝細胞など胚葉を超えて様々な組織に分化することができる。さらには、自らの脂肪組織から直接採取を行うために ES 細胞や iPS 細胞のような倫理面、癌化の心配が少なく、再生医療の材料として臨床への応用が期待されている[46]。

培養する際の培地は、DMEM (High Glucose) (ナカライテスク) に 10% FBS (Biological Industries または Biosera)、1% ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (ナカライテスク) を加えたものを使用した。以下、この培地を単に DMEM 培地と表記する。

②細胞の継代と培養

細胞は 60 mm または 100 mm ディッシュプレートを用い、80%コンフルエントになるま

で培養した。80%コンフルエントになったら培地を除去し、PBS (-) で1回洗浄した後にトリプシン-EDTA 液を添加し、37°C で3分間インキュベートして反応させた。その後、トリプシン-EDTA 液と等量の DMEM 培地を加えてピペッティングにより細胞をプレートから剥がし、1.5 mL チューブや 15 mL チューブに回収した。回収した細胞溶液は 1,100 rpm で3分間遠心した後上清を除去し、適量の DMEM 培地に懸濁した。この懸濁液のうち5分の1から10分の1量を DMEM 培地入りの新しいディッシュプレートに播種し、培養をした。培養は 37°C の 5% CO₂ インキュベーターで行った。

以下に実験に使用した試薬の組成を記載する。

- 10×PBS (-)

1.37 M	NaCl
27 mM	KCl
100 mM	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O
18 mM	KH ₂ PO ₄

→ 実験の際には水で 10 倍に希釈し、オートクレーブして使用した。

- トリプシン-EDTA 溶液

0.2% (v/v)	トリプシン (Invitrogen)
1 mM	EDTA (pH 8.0)

→ PBS (-)に溶解して使用した。

③細胞の保存と融解

細胞を保存する際は、上記の方法で細胞を回収、遠心、上清の除去をした後に 1 mL の CultureSure Freezing Medium (和光純薬工業)に細胞を懸濁し、1.5 mL チューブに分注した。このチューブは-80°C で Cool Cell アルコールフリー細胞凍結コンテナ (biocision) に入れて一晩凍結させた後に、液体窒素に移して保存をした。

細胞を融解する際は、保存していたチューブを 37°C の湯浴で温めた後、細胞溶液を 1 mL DMEM 培地が入った 15 mL チューブに移し、1,100 rpm で3分間遠心した後に DMEM に懸濁した。これを 60 mm または 100 mm ディッシュプレートに播種し、培養をした。

2-3.脂肪細胞分化誘導

- 脂肪分化誘導培地組成

DMEM

10% FBS	
3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (Nakalai tesque)	0.5 mM
Dexamethasone (Sigma)	1 μ M
Insulin (Nakalai tesque)	10 μ g/mL
Troglitazone (Wako)	5 μ M

•分化培地組成

DMEM	
10% FBS	
Insulin (Nakalai tesque)	10 μ g/mL

6 well プレート (33.78 mm/well、TPP) の 1 well あたりに ASC を 2.5×10^5 cells 播種し、37°C の CO₂ インキュベーターで 2 日間培養し、細胞をコンフルエントな状態にした。コンフルエントになった時点から 2 日後を day 0 とし、脂肪分化誘導培地に交換し 2 日間培養した。2 日間培養後、分化培地に交換し、その後は 2 日おきに分化培地で培地交換を行い 9～12 日間培養した。

2-4.Oil Red O による脂肪滴の染色

①Oil Red O 染色液の作製

300 mg の Oil Red O (Sigma) を 100 mL の 99% 2-propanol (Wako) に 60°C 一晩かけて溶解した。その後、この溶解液を滅菌水で Oil Red O が 60% になるように希釈し、10～30 分間激しく振盪した後、0.22 μ m membrane filter (MILLPORE) と 50 mL テルモシリンジ(TERUMO)を用いて濾過した。この操作を経たものを Oil Red O 染色液として使用した。染色液は濾過後 2 時間以内に使用した。

②細胞内脂肪滴の染色

0～9 日間分化刺激を行った ASC を 1 well あたり 1 ml の PBS(-) で 2 回洗浄した。

↓

4% PFA を 1 well あたり 1 mL 加え、10 分間室温で静置し細胞を固定した。

↓

PBS(-) で 2 回洗浄し、60% 2-propanol を 1 well あたり 1 mL 加え、室温で 1 分間静置した。

↓

60% 2-propanol を除去し、Oil Red O 染色液を 1 well あたり 1 mL 加え室温で 10 分間静置し染色を行った。

↓

染色後の細胞は 40% 2-propanol で 1 回洗浄し、その後 PBS(-)で 2 回洗浄した。

↓

1 ml の PBS(-)を添加し、染色後の細胞を蛍光顕微鏡 BZ-8100 (KEYENCE)を用いて観察した。

2-5. ウェスタンブロッティング法

①細胞ライセートの調製

3.5cm シャーレで培養し脂肪分化誘導を行った ASC を PBS(-)で 2 回洗浄し、100 μ L の SDS 細胞回収バッファーを加えスクレーパーで細胞を剥がした後、1.5mL チューブに回収した。回収したサンプルは水中で超音波破碎をした。4°C、15000 rpm で 30 分間遠心し上清を-20°C で保存した。

•SDS 細胞回収バッファー

0.125M	Tris-HCl Buffer (pH6.8)
4% (w/v)	SDS
10% (w/v)	スクロース (国産化学)

②BCA アッセイ

Protein Assay Bicinchoninate Kit (Nacalai tesque)を用いて行った。検量線作製には BSA を用いた。測定にはモデル 680 マイクロプレートリーダー(Bio-Rad)を用い、570nm の吸光度を測りタンパク質量を算出した。

③SDS 化

適当量のタンパク質溶液に、5 \times SDS sample buffer を加え、3 分間煮沸処理した。

•5 \times SDS sample buffer

0.125M	Tris-HCl Buffer (pH6.8)
--------	-------------------------

10% (v/v) 2-メルカプトエタノール

4% (w/v) SDS

10% (w/v) スクロース (国産化学)

0.01% (w/v) BPB (Amersham)

④SDS-PAGE

ゲルをセットした泳動槽 (日本エイド) に SDS-PAGE 泳動バッファーを満たし、SDS 化したサンプルタンパク質を便宜アプライした。また、分子量マーカーとして Prestained Protein marker, Broad Range (New England Biolabs) と Dr. Western (オリエンタル酵母) を 10:1 の比で混合したものを同時泳動した。

•分離ゲル (10%)

1.5M Tris-HCl (pH8.8)	2.5mL
30% Acrylamid/Bis 混合液 (37.5:1)	3.1mL
10% (w/v) SDS	100μL
10% (w/v) APS	100μL
DDW	4.23mL
TEMED	7μL

•濃縮ゲル

0.5M Tris-HCl (pH6.8)	750μL
30% Acrylamid/Bis 混合液 (37.5:1)	450μL
10% (w/v) SDS	30μL
10% (w/v) APS	30μL
DDW	1.75mL
TEMED	2.5μL

•10×SDS-PAGE 泳動バッファー

0.25M Tris

1.92M グリシン

1% (w/v) SDS

⑤ウエスタンブロッティング

6×9 cm の大きさに切った PVDF 膜 (Pall corporation) をメタノール中で 30 秒振盪させ親水処理を行った後 blotting buffer に浸して平衡化した。事前に blotting buffer に浸して準備したゲルと同じサイズに切ったろ紙を用い、気泡が入らないように PVDF 膜、ゲルを挟んでトランスブロット SD セル(Bio-Rad)にセットした。転写条件は、2mA/cm²、75 分間とした。転写後、5%スキムミルク/0.1%TBS-T(Tris-buffered saline, 0.1% Tween-20)溶液に浸し室温で 30 分間ブロッキングを行った。0.1%TBS-T で 5 分間、3 回洗浄した後、ハイブリバックにタンパク質転写した PVDF と一次抗体を封入し、4°Cで一晩振盪し反応させた。翌日、一次抗体を回収した後に 0.1%TBS-T で 5 分間、3 回洗浄し、同様にハイブリバック PVDF 膜と二次抗体を封入して、室温で 1 時間振盪し二次抗体反応を行った。その後、PVDF 膜を 0.1%TBS-T で 5 分間、3 回洗浄し、検出試薬を膜上に滴下し 1 分間反応させた後、LAS3000(FUJIFILM) で検出を行った。

•blotting buffer

25mM	Tris
192mM	Glycine
20% (v/v)	Methanol

•10×TBS (pH7.4)

137M	NaCl
2.7M	KCl
25M	Tris

•検出試薬

Solution A

Milli Q	2.125mL
1.5M Tris-HCl (pH8.8)	0.25mL
250mM luminol/DMSO	25μL
90mM p-coumaric acid/DMSO	11μL

Solution B

Milli Q	2.25mL
---------	--------

1.5M Tris-HCl (pH8.8) 0.25mL

30% H₂O₂ 1.5μL

Solution A と Solution B を其々調製し、検出の直前に 2 つを混合して使用した。

・ウェスタンブロッティング法で使用した抗体

Name	Supplier(Product number)			
First antibody				
anti-Pin1 (mouse)	R&D systems (MAB2294)			1:1000
anti-α-tubulin (mouse)	Sigma Aldrich (T9026)			1:2000
anti-activated Notch1 (rabbit)	Abcam (ab8925)			1:500
anti-cleaved Notch1 (rabbit)	Cell Signaling (#4147)			1:1000
Second antibody				
anti-mouse IgG	R&D system (HAF007)			1:1000
anti-rebbit IgG	Cell Signaling (#7074)			1:1000

2-6.レトロウイルスによる *NICD* 遺伝子導入

①HEK293T 細胞へのプラスミド導入

まず HEK293T 細胞を 3.0×10^6 細胞ずつ 10 cm ディッシュに播種して一晩 37°C、5% CO₂ の条件下にて培養した。翌日、VSVG、HIV、NICD がそれぞれ 10 μg 含まれるようプラスミド溶液を調製した。次に、DMEM（無血清） 2.4 mL に 1M PEI 54 μL を加えて室温で 5 分間放置した。5 分後、調製したプラスミド溶液を加えて 10 分間放置した。10 分後、HEK293T 細胞を播種したディッシュに HEK293T 細胞が剥離しないよう 3 枚のディッシュに各 800 μL ずつディッシュの側面からゆっくりと加えて、溶液が均一になるまで静かに攪拌し 37°C、5% CO₂ の条件下にて 2 日間培養した。

②培地交換

導入後 2 日間培養して、1 μg/mL ホルスコリン-DMEM 培地に培地交換を行い、更に 2 日間培養した。ホルスコリンはパッケージング効率を上昇させることで HEK293T 細胞のウイルス産生能を上昇させるために使用した。

③培地回収と濃縮

培地交換後 2 日間培養した HEK293T 細胞のディッシュ 3 枚分の培地を 1 本のチューブに回

収した。回収した培地を 0.45 μ M (MILLIPORE) フィルターに通し 50ml チューブに回収した。その回収した培地にウイルス濃縮液を 10 mL 加えよく混ぜて 4°C にて一晩放置した。なお、ウイルス濃縮液は沈みやすいため、使用前によく攪拌した。

④ウイルス溶液の調製と感染

翌日、チューブを 4°C、3,500 rpm で 1 時間、swing で冷却遠心した。遠心後にペレットを 1.4 mL の DMEM 培地に懸濁して 1.5 μ L のポリブレン(4 mg/mL)を加えウイルス溶液とした。このウイルス溶液を、前日 3.5 mL デイッシュに 1.0×10^5 細胞ずつ播種しておいたターゲット細胞 (ASC) に全量加え一晩培養した。培養後、通常の DMEM 培地に培地交換を行い、コンフルエントに近くなるまで培養し目的に応じて継代した。

・ウイルス濃縮液の調製

160g の PEG6,000 を 40 mL の 5M NaCl 溶液、20 mL の 1M HEPES (pH7.4)、超純水にて溶解して 500 mL にフィルアップ後、オートクレーブにかけてウイルス濃縮液とした。

第3節 結果

高脂肪食給餌群の体重は、普通食給餌群の体重増加に比べ大きな傾きで増加する一方、高脂肪食給餌にもかかわらず褐藻類ポリフェノールを経口投与することにより、体重増加が著しく抑えられた。また、高脂肪食給餌かつ褐藻類ポリフェノール経口投与群の8週間後の体重は普通食給餌群とほぼ変わりがなかった(Fig.4A)。

実験開始8週間後に、全てのマウスを解剖し、皮下脂肪と内臓脂肪重量を測定した結果がFig.4Bである。体重増加が抑制された高脂肪食給餌かつ褐藻類ポリフェノール経口投与群では脂肪重量も有意差ある減少を示した(Fig.4B)。

さらに、解剖時に採取した血液を用い、血清中のレプチン、総コレステロール、遊離脂肪酸、中性脂肪、アディポネクチン量を測定した。その結果、高脂肪食給餌かつ褐藻類ポリフェノール経口投与群のレプチンと総コレステロール量は、高脂肪食給餌により上昇した数値が、普通食給餌群と近い値まで回復していることが明らかとなった(Fig.5)。これは褐藻類ポリフェノール投与により脂肪細胞マーカー分子の発現レベルを変化させている可能性が示唆された。

次にマウス解剖後の脂肪を固定し、HE染色を行った。その結果、高脂肪食により肥大した脂肪細胞に対し、高脂肪食給餌かつ褐藻類ポリフェノール投与群の脂肪細胞の大きさは、普通食給餌群により近いことが明らかにわかった(Fig.6)。

一方で褐藻類ポリフェノールの基礎的な機能を調べる為に、NIH3T3-L1細胞を用い脂肪分化への影響を実験した。脂肪細胞分化誘導を行い脂肪滴の染色量を測定した結果、褐藻類ポリフェノール添加濃度が濃いほど、脂肪分化が強く抑制されていることがわかった(Fig.7A)。さらに脂肪細胞における遺伝子レベルの研究の重要性を考え、脂肪細胞分化に重要な転写因子である *PPAR γ* , *C/EBP α* , *GLUT4*, *FABP4*, *LPL* の発現量をPCRによって調べた。その結果、褐藻類ポリフェノール添加によって、脂肪細胞マーカーの発現が抑制されていることが明らかとなった(Fig.7B)。

そこで、*in vitro* 実験として、脂肪由来間葉系幹細胞(Adipoe-Derived Mesenchymal Stem Cell : ASC)の脂肪細胞分化における Pin1 の影響を調べることにした。ASC は、不死化を目的として p53 ノックアウトマウス由来クローン性 ASC 株細胞 (Pin1 WT-ASC) の#5 株を野生型とし、p53/Pin1 ダブルノックアウトマウス由来クローン性 ASC 株細胞 (Pin1-KO ASC with mock)の#j mock 株を Pin1 KO として継代して実験に使用した [45]。WT-ASC では4日目から脂肪滴が確認でき経時的に増加するが、Pin1-KO ASC ではほとんど脂肪滴が観察されな

かった。Pin1-KO ASC にレンチウイルスにより Pin1 を過剰発現させた#j rescue 株(Pin1-KO with lentiviral Pin1) では WT-ASC と同様に脂肪分化が正常であることが確認でき、つまり Pin1 欠損による脂肪分化阻害であることがわかった。更に、この脂肪分化誘導をかける前の#j mock 株 及び、#j rescue 株から RNA を抽出し、Filgen®に DNA マイクロアレイ受託解析を依頼した。データ解析の結果、Pin1 の高発現によって (#j rescue の遺伝子発現量) / (#j mock の遺伝子発現量) ≤ 0.5 を 2DOWN とし、遺伝子の発現量に変化が見られるものとしてピックアップした(Table.1)。この中で Notch1 受容体のリガンドである *jagged1* の減少を発見した。Notch 受容体は膜貫通型受容体であり、リガンドが結合すると細胞表面の Notch 蛋白は Presenilin1 や γ セクレターゼに切断されて、細胞内ドメインである Notch intracellular domain (NICD)が細胞質へ遊離して核内の CBF-1 と結合することで標的遺伝子の転写活性が行われる。この NICD に着眼し、Pin1 と NICD の関係を調べる為に NICD を過剰発現させた ASC の作製を試みた。レンチベクターに導入した NICD コンストラクトが Fig.9A であり、Fig.9B では ASC に形質導入された GFP 発光を顕微鏡下で確認した。Fig.8 同様 ASC の脂肪細胞分化誘導を行ったところ、NICD 過剰発現により、脂肪分化が抑制されていることが明らかとなった(Fig.10)。さらに、脂肪細胞分化誘導実験を行うと同時に RNA を採取し、DNA 定量ために RT-PCR を行った。その結果、NICD を過剰発現させた ASC で NICD の mRNA 量の増加を確認できた(Fig.11)。

第4節 考察

褐藻類ポリフェノールの経口投与により、高脂肪食給餌群において、マウスの体重増加を抑制すると同時に、皮下脂肪及び内臓脂肪蓄積量を減少させるという結果が得られた。一方で、血清中の脂肪マーカー測定量は、普通食を給餌したコントロール群マウスの測定値により近い値となっていることから、褐藻類ポリフェノール経口投与による脂肪細胞減少は、脂肪細胞活性を消失することなく行われていることが考えられた。特に、脂肪細胞から産出されるレプチンや、同じく脂肪細胞から分泌される分泌蛋白であるアディポネクチンの量が減少したことから、褐藻類ポリフェノールは細胞レベルでの効果が期待された。

また、脂肪蓄積量減少の結果は、組織化学的な実験結果により強調された。褐藻類ポリフェノール投与により、高脂肪食給餌による脂肪細胞の肥大を抑制していた。この結果を裏付ける為に、脂肪細胞分化モデル細胞で知られている NIH3T3-L1 細胞を用い *in vitro* 実験と比較した。既知の Pin1 阻害剤である juglone や PiB (diethyl- 1,3,6,8- tetrahydro- 1,3,6,8- tetraoxobenzol-phenanthroline- 2,7-diacetate)での脂肪細胞分化阻害と同様なことが明らかとなり[39]、褐藻類ポリフェノールは天然物由来であることから今後の活用に期待がかかる。さらにより生体に近い実験を行うために、脂肪由来間葉系幹細胞である ASC を用いた実験を行った。

ASCから抽出したRNAを用いたマイクロアレイの結果で着眼したNotchは、受容体が細胞外ドメインと細胞内ドメイン(NICD)とに分かれている膜貫通受容体である。Jagged1などのリガンドが細胞外ドメインに結合すると、Presenilin1や γ セクレターゼによるNICDの切断を介してNotchシグナルが活性化する。Notchシグナルが活性化されると、PPAR γ の発現が抑制され、結果として3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化が抑制されると報告されている[47]。

Pin1 と Notch シグナルとの関係に関する過去の報告では、*Pin1/p53* DKO マウスの胸腺で Notch の細胞内ドメインの切断を行う Presenilin1 の発現の上昇とともに Notch の細胞内ドメインの発現が上昇することが報告されている [28]。マイクロアレイの結果から、Notch のリガンドである Jagged1 をコードする *Jag1* の発現が# *j rescue* で低いことから、Pin1 が存在するとリガンドの減少による Notch シグナルの不活性化が起きていることが予想された。そこで活性型である NICD を ASC に過剰発現させ脂肪細胞分化誘導を行った結果、予想通り脂肪細胞分化は抑制された。しかし、Pin1 と NICD の分子基盤は未解決のところが多い。NICD は、発現・活性化等様々な経路による制御を受けており、今後は Pin1 がどの経路を

介して ASC の脂肪細胞分化に関与しているのか全容が解明されれば、ASC の効率的かつ安全な利用に直結するであろうことが期待される。

総合考察

生体における Pin1 の分子基盤の獲得を目的とし、そのアプローチとして、Pin1 による幹細胞分化制御の機能解析を博士課程で行ってきた。精巣の萎縮が、Pin1 欠損による精細胞の減少によるものだと言われてきたが、その減少の原因は未分化型精原細胞に分類される前駆細胞の分化抑制によるものであり、かつ精子幹細胞は減少していないことが証明できたのは大きな獲得であった。さらに Pin1 は精子幹細胞の細胞周期を遅延していることが示唆され、幹細胞に関与していることが証明されたことは今後の研究に一步前進したことであろう。脂肪由来間葉系幹細胞(Adipoe-Derived Mesenchymal Stem Cells : ASCs)は、生体内の脂肪組織中に存在する間葉系幹細胞の一つであり、中胚葉系に属する骨や軟骨、脂肪細胞への分化能を持ち、さらに肝細胞や神経細胞など、胚葉を超えて分化できる多分化能を持つことが知られている。ASCs の元となる細胞の採取は自らの脂肪組織から行うことができ、iPS 細胞作製のように遺伝子導入する必要があることからガン化の心配が少なく、また ES 細胞のように受精卵を用いる必要があることから倫理面の問題が少ないメリットがあり再生医療の材料として有用であると考えられる。一方で詳しい分化のメカニズムなど不明な点も多く、その解明によって、より効率的な臨床への応用が期待される細胞である。

ASCs はこのように高い分化能を持つことが知られており、その分化メカニズムには Pin1 分子が重要な役割をしているのではないかと注目してきた。当研究室卒業生により Pin1 は ASCs の脂肪細胞分化を促進させることを証明されており、さらに Pin1 阻害剤として天然物由来の褐藻類ポリフェノールの抽出にも成功していた。そこで私は *in vivo* 実験として、動物実験を行い、脂肪蓄積の減少と分子生物学的に組織レベルでの検証結果を得ることに成功したことは、将来的に実用できるアプローチになったと考える。

両者、精子幹細胞において、Pin1 欠損により精子幹細胞の自己複製阻害が明らかとなったことと、間葉系幹細胞の脂肪分化阻害が明らかになったことにより、Pin1 は様々な組織に発現しているものの、幹細胞の維持・分化に重要な役割を果たしていることが共通点として明らかとなってきた。

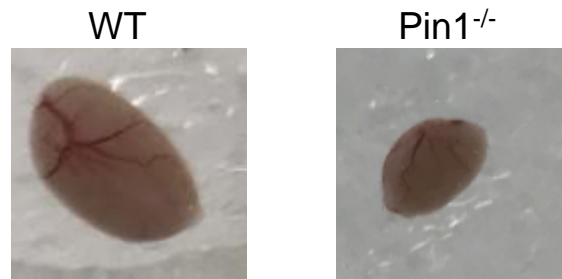
さらに、間葉系幹細胞の脂肪細胞分化阻害を NICD 過剰発現で誘導できたことが、山中因子の形質導入で iPS 細胞の安定性と分化の効率上昇に Pin1 が関与するという報告や、セルトリ細胞に強発現している Pin1 が精子形成の維持に関与しているとの報告[48]など様々な先行実験とどう結びつきがあるのか立証していくことが今後の課題である。幹細胞の

分化制御と Pin1 のメカニズムを明らかにすることで自己複製と分化の解明につながると期待される。

酵素は生体内や細胞でのメカニズムの解明だけではなく、例えば代謝異常を引き起こす原因となる酵素を阻害する物質が探索され、創薬に応用されている。また、がん細胞を自滅させる働きのある酵素や、がん細胞を大きくさせる働きをもつ酵素などを探索することで、患者の体に負担の少ないがん治療への応用が期待されている。さらに、酵素自体をバイオセンサーとして利用することで生体内や食品、環境中の物質の高感度な定量システムへ応用する試みがなされている。酵素を用いたバイオセンサーで実用化されているものでは、血糖値測定に使用するグルコースセンサーがよく知られている。Pin1 は幹細胞に働く重要な酵素である可能性が示唆され、それをモニタリングしたり調整したりすることにより、男性避妊薬や安全にダイエットするなど医学等に応用できると期待している。

A

38 weeks testis



B

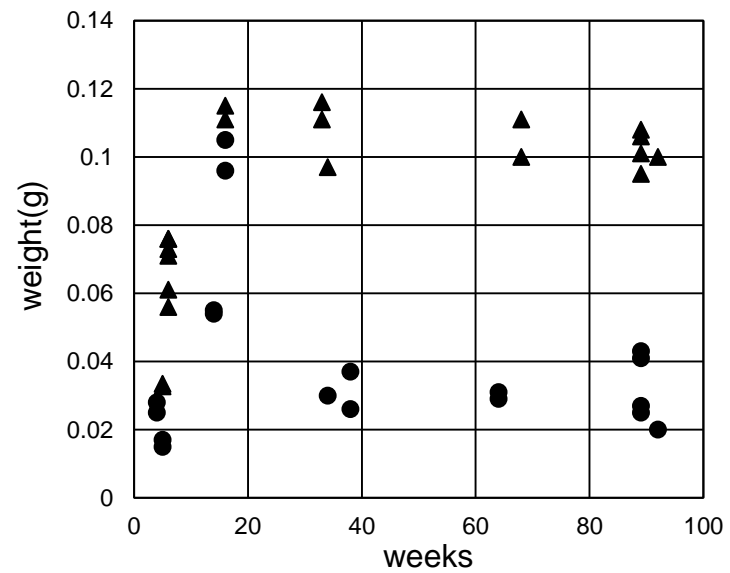


Fig.1 Testicular atrophy of Pin1^{-/-} mice.

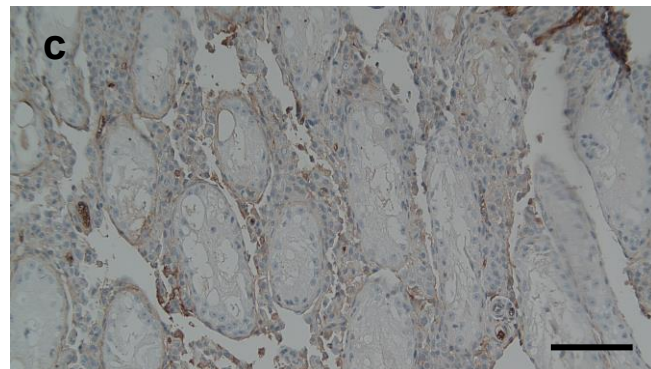
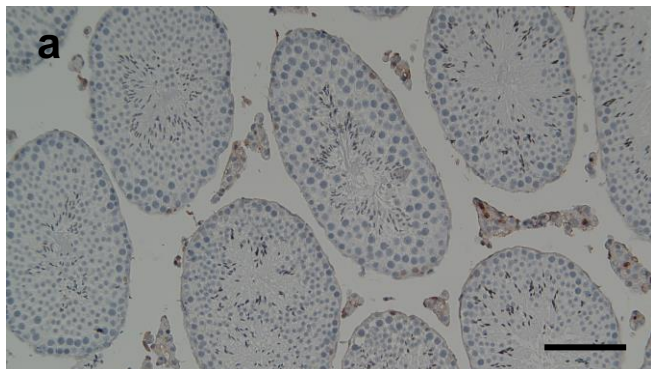
(A) Testes of 38 weeks old WT and Pin1^{-/-} mice. (B) Testes weights of WT (triangle) at 4,5, 6, 16, 33, 34, 68 and 92 weeks and Pin1^{-/-} testes (circle) at 14, 16, 34, 38, 64, 89 and 92 weeks.

A

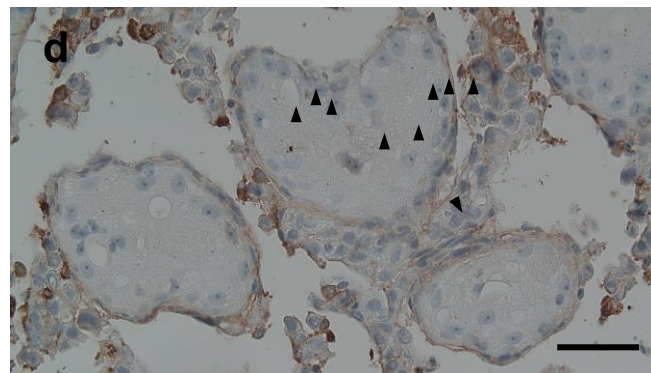
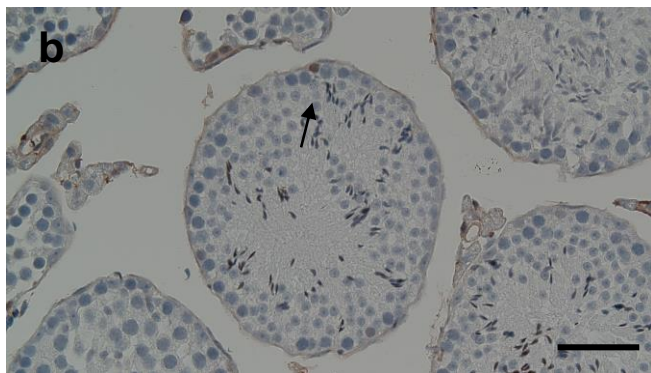
WT

Pin1^{-/-}

20x

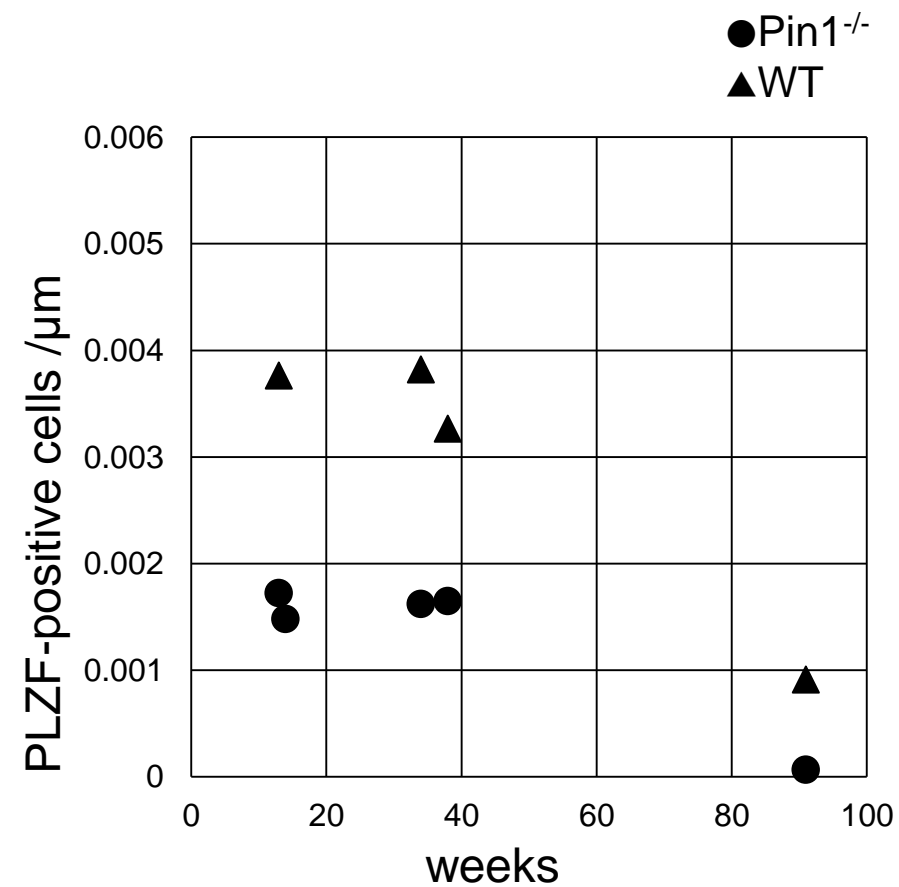


40x



92 weeks old

B



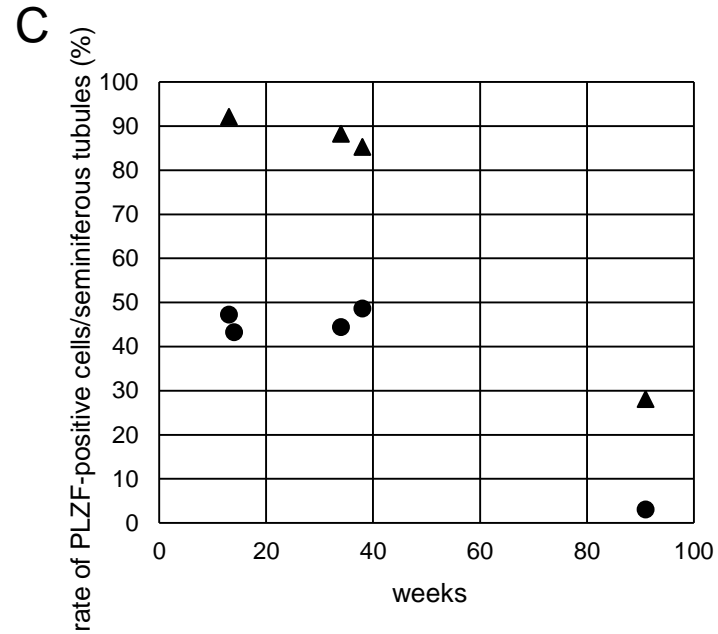
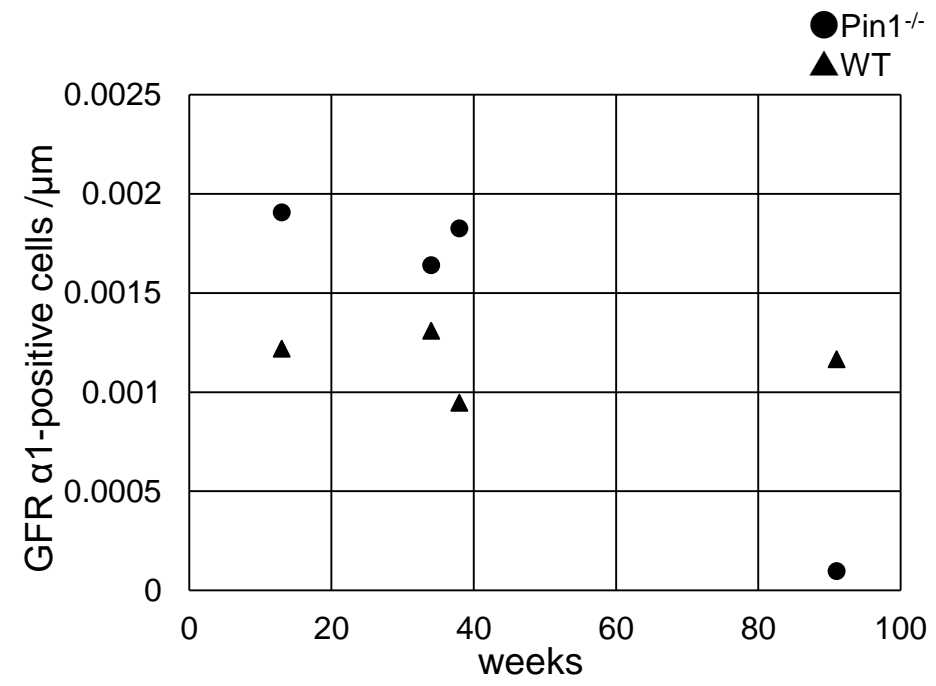
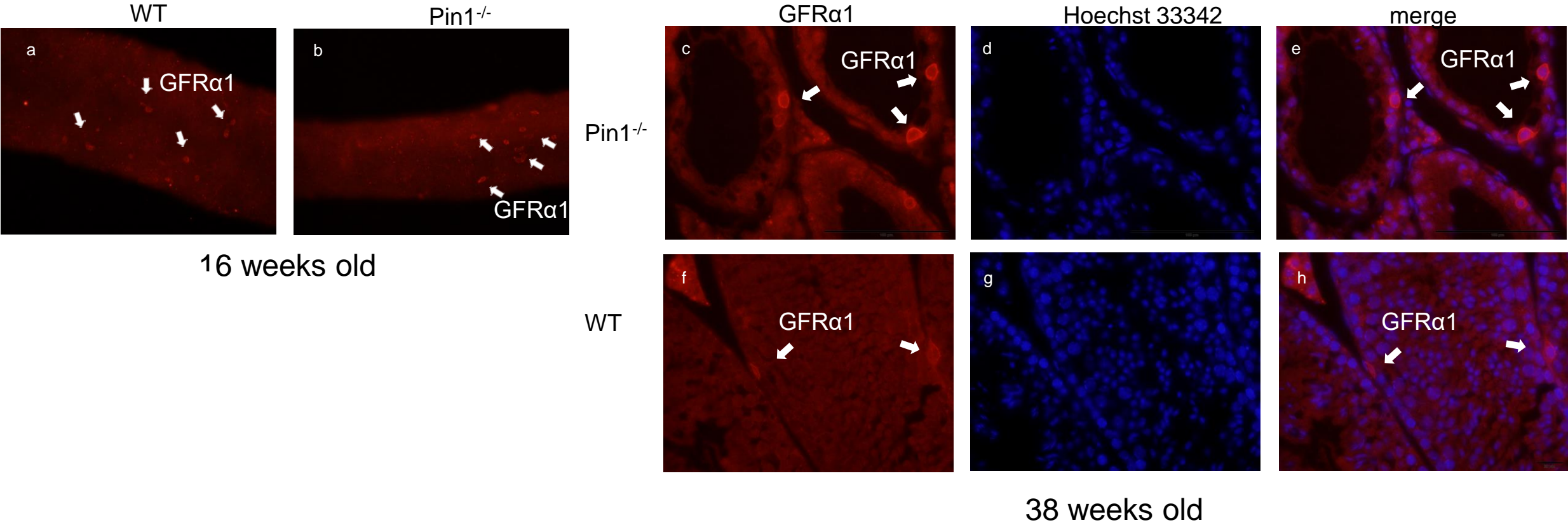


Fig.2 PLZF-positive spermatogonia cells in seminiferous tubules of WT and Pin1^{-/-} mice. (A) Comparison of PLZF-positive spermatogonia cells in WT [A-a, b] and Pin1^{-/-} mouse [A-c, d] testes of 92 weeks old. A PLZF- positive spermatogonia cell is shown by an arrow [A-b], and Sertoli cells were shown by wedges [A-d]. Magnification of 20x [A-a, c] and 40x [A-b, d]. Bar= 100 μ m [A-a, c] and 50 μ m [A-b, d]. (B) Frequency of PLZF-positive cells in the basement membrane of seminiferous tubules at each age (number/ μ m). (C) The ratio of seminiferous tubules that reside at least one PLZF-positive cell out of total tubules

A



B



C

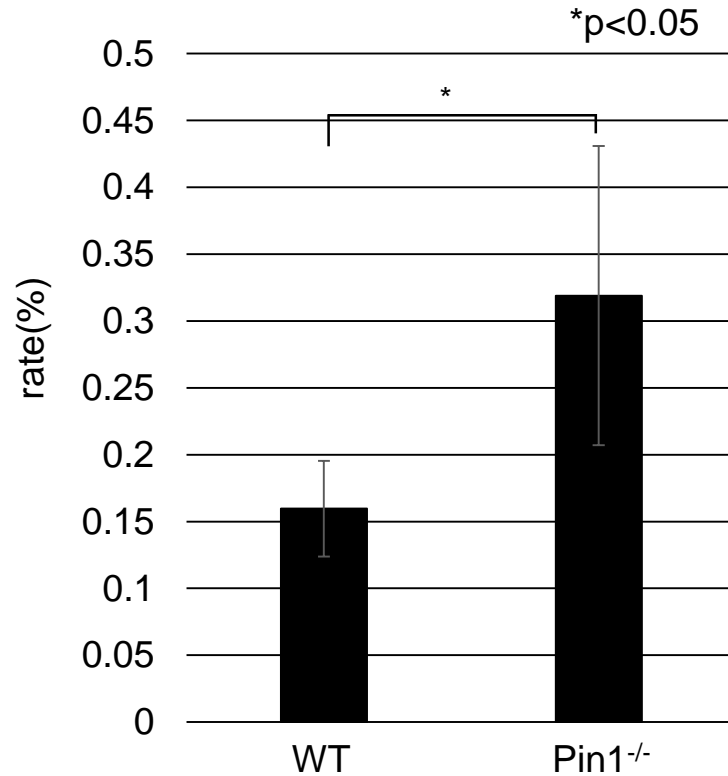


Fig.3 GFRα1-positive spermatogonia in seminiferous tubules of WT and Pin1^{-/-} mice. (A) Frequency of GFRα1-positive cells in the basement membrane of seminiferous tubules at each age. (B) Whole-mount immunofluorescence staining of 16 weeks old testes with anti-GFRα1 antibody. GFRα1-positive cells were indicated by the arrows[B-a,b] and immunofluorescence staining of 5 μm section of 38 weeks old Pin1^{-/-} (bar=100 μm) and WT (bar=20 μm) mice testes (60x) with anti-GFRα1 antibody [B-c,f], Hoechst 33342[B-d,g] and the merge [B-e,h]. (C) Comparison of the rates of GFRα1/phospho-histone H3 double positive spermatogonia in GFRα1-positive spermatogonia between Pin1^{-/-} and WT mice testes (n=5).

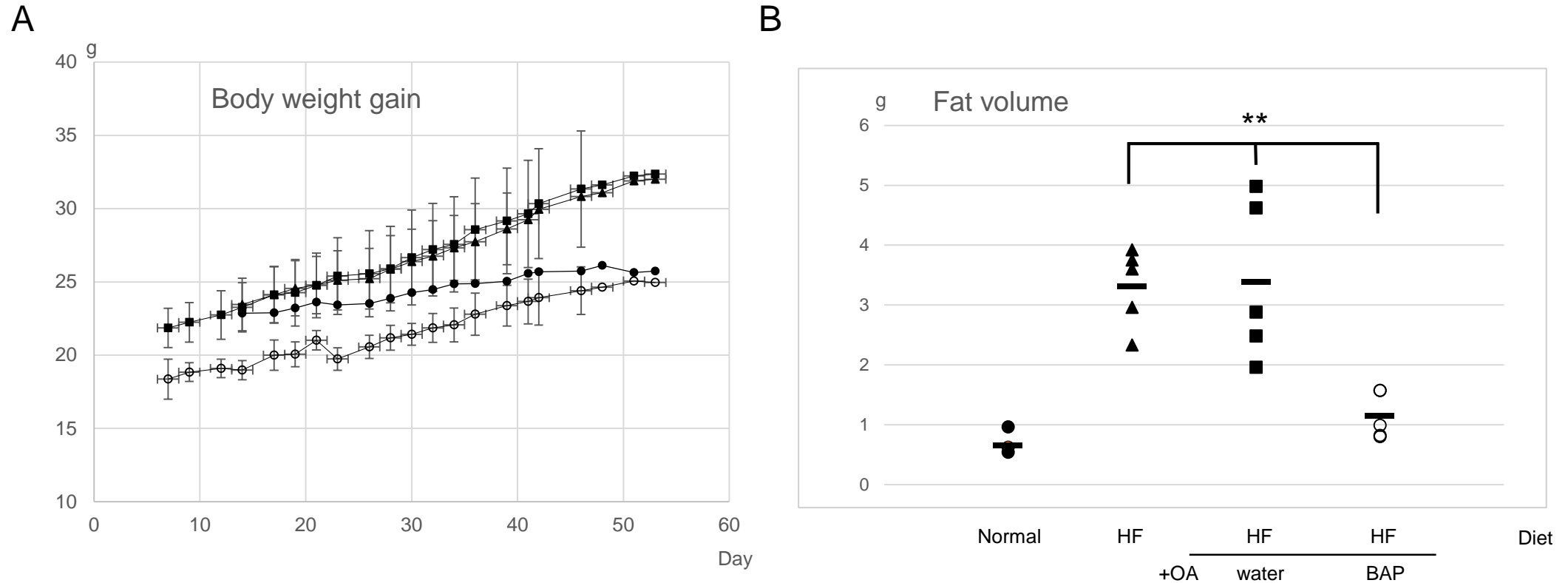


Fig.4 Comparison of weights of mice fed with a normal diet, a high fat diet, a high fat diet plus water, and a high fat diet plus brown algae polyphenol. C57BL/6j male mice at 4-weeks old (n=5) were fed with a normal diet (closed circle), a high fat diet (closed triangle), a high fat diet with oral administration of water (closed square), and a high fat diet with oral administration of brown algae polyphenol (open circle) (means \pm SD). Oral administration of brown algae polyphenol or water was started after the mice were provided water freely and no food for a day. 10 μ M of brown algae polyphenol was provided with the high fat diet for 8 weeks. (A) Measurement of body weight and (B) comparison of fat volume in mice (n=5). Water for group3 and brown algae polyphenol for group4 were administered orally. The data were analyzed by 1-way Anova followed by Bonferroni post Hoc test. **P<0.01.

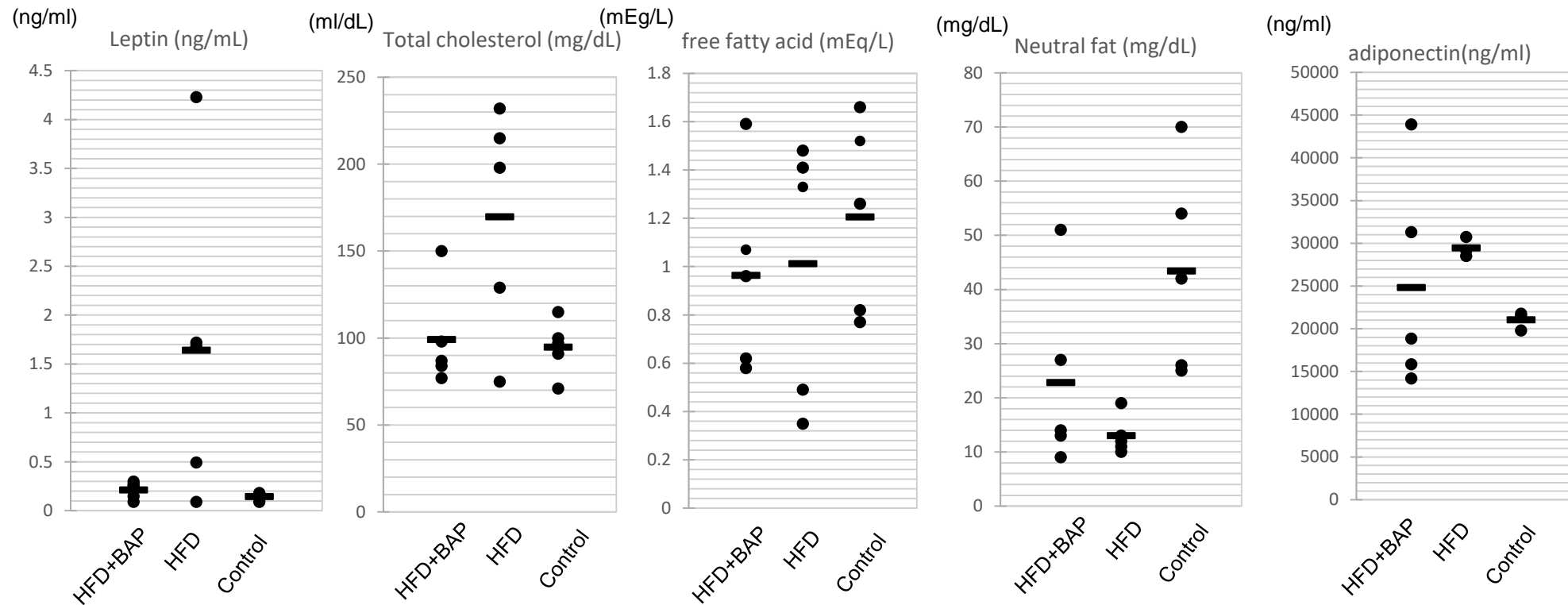


Fig.5 Comparison of obesity marker levels in sera between mouse groups (n = 5 each). Leptin (ng/ml), total cholesterol (mg/dl), free fatty acids (mEq/L), neutral fat (mg/dl), and adiponectin (ng/ml) in the serum of each mouse, 1: high fat diet + brown algae polyphenol, 2: high fat diet, 3: normal diet.

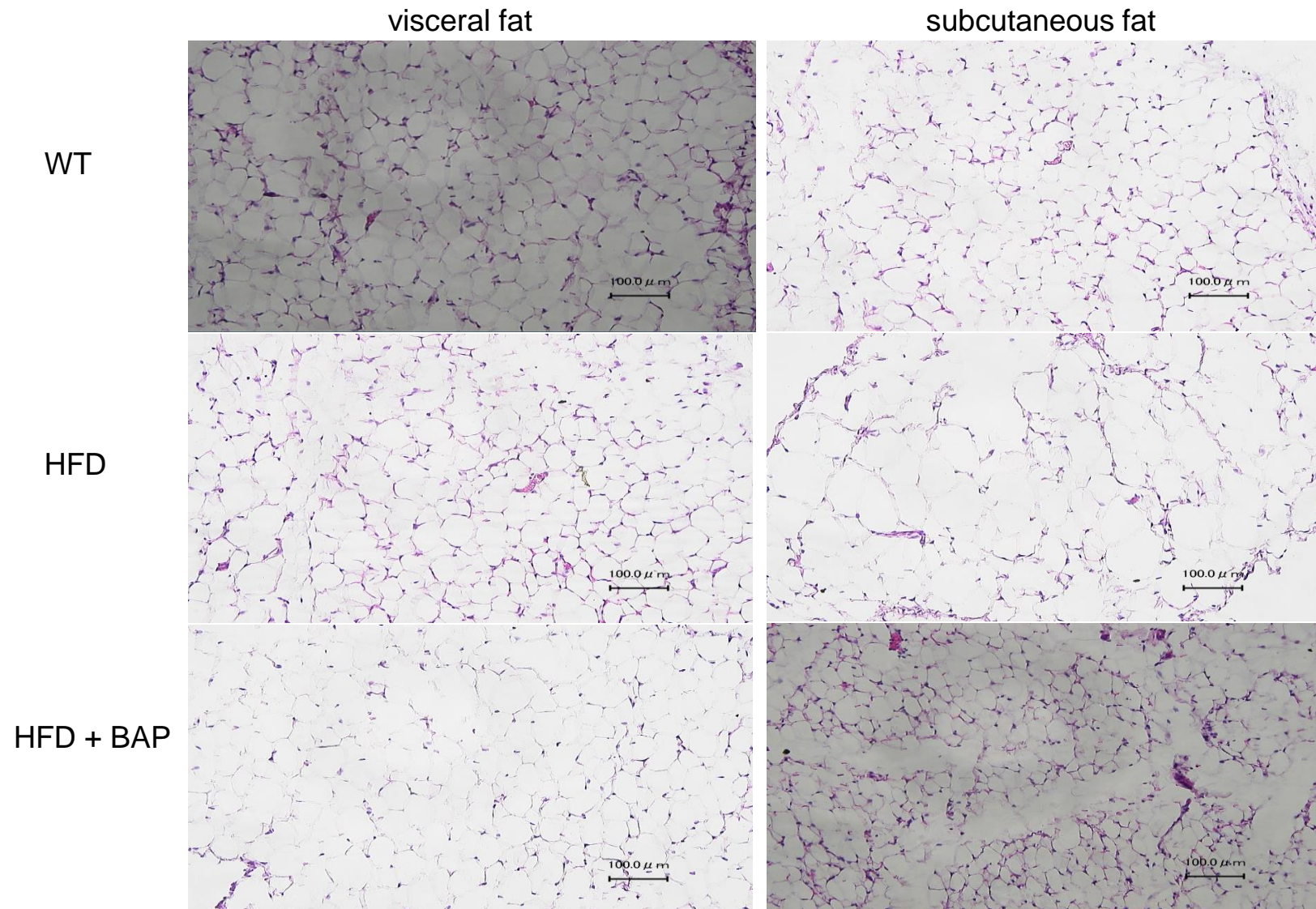
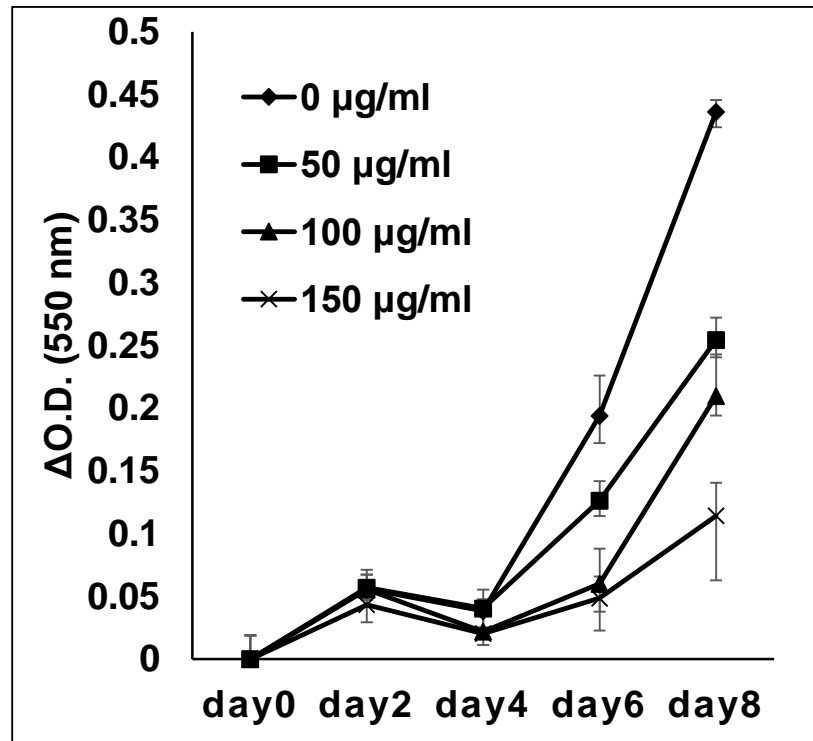


Fig.6 Paraffin-embedded sections of visceral and subcutaneous fat tissue from mice fed with a normal diet (WT), high fat diet (HFD) and high fat diet plus brown algae polyphenol (HFD+BAP) were stained with hematoxylin and eosin (bar=100 μ m).

A



B

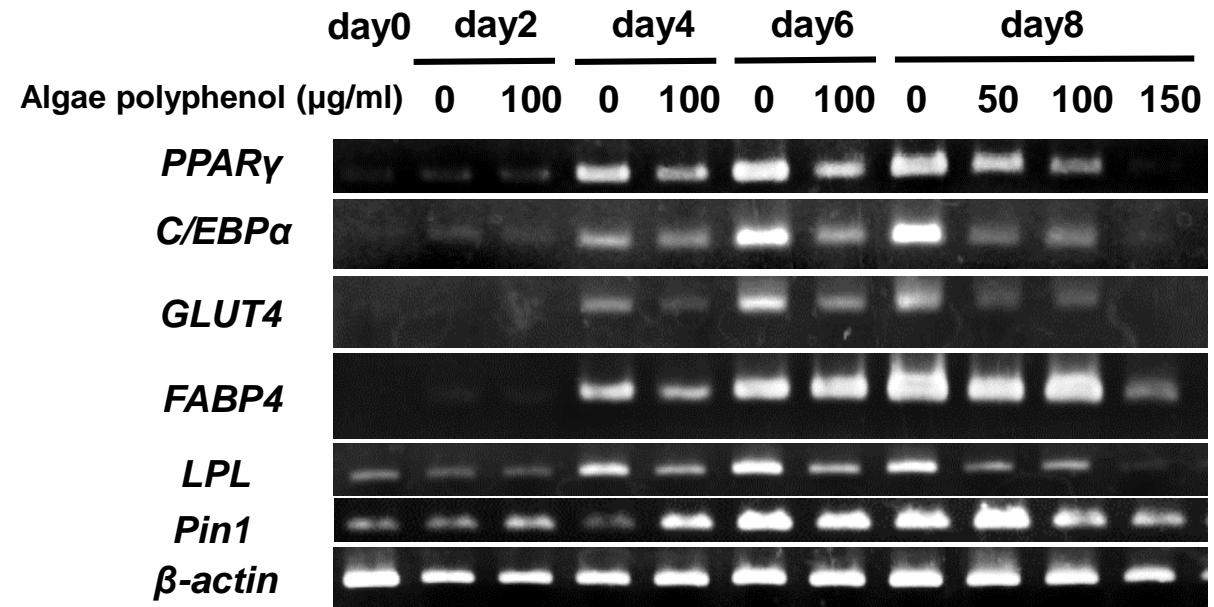


Fig.7 Effect of brown algae polyphenol on the differentiation of NIH3T3-L1 cells to adipocytes

(A) The amount of the intracellular lipid stained with oil red O. NIH3T3-L1 cells were cultured in DMEM containing 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1μM dexamethasone, and 1.7μM insulin with 0 (diamond), 50 (square), 100 (triangle), and 150μg/ml (x) brown algae polyphenol for 0–8 days. NIH3T3-L1 cells were treated with 4% paraformaldehyde and 60% 2-propanol and then stained with Oil Red O. The amount of oil red O extracted from the cells was determined three times by measuring absorbance at 550 nm (means ± SEM). (B) PCR analysis of adipocyte biomarker mRNA levels. NIH3T3-L1 cells were cultured with 0, 50, 100, and 150μg/ml of brown algae polyphenol for 0–8 days. The mRNA levels of PPARγ, C/EBPα, Glut4, FABP4, and LPL in these cells were compared by PCR.

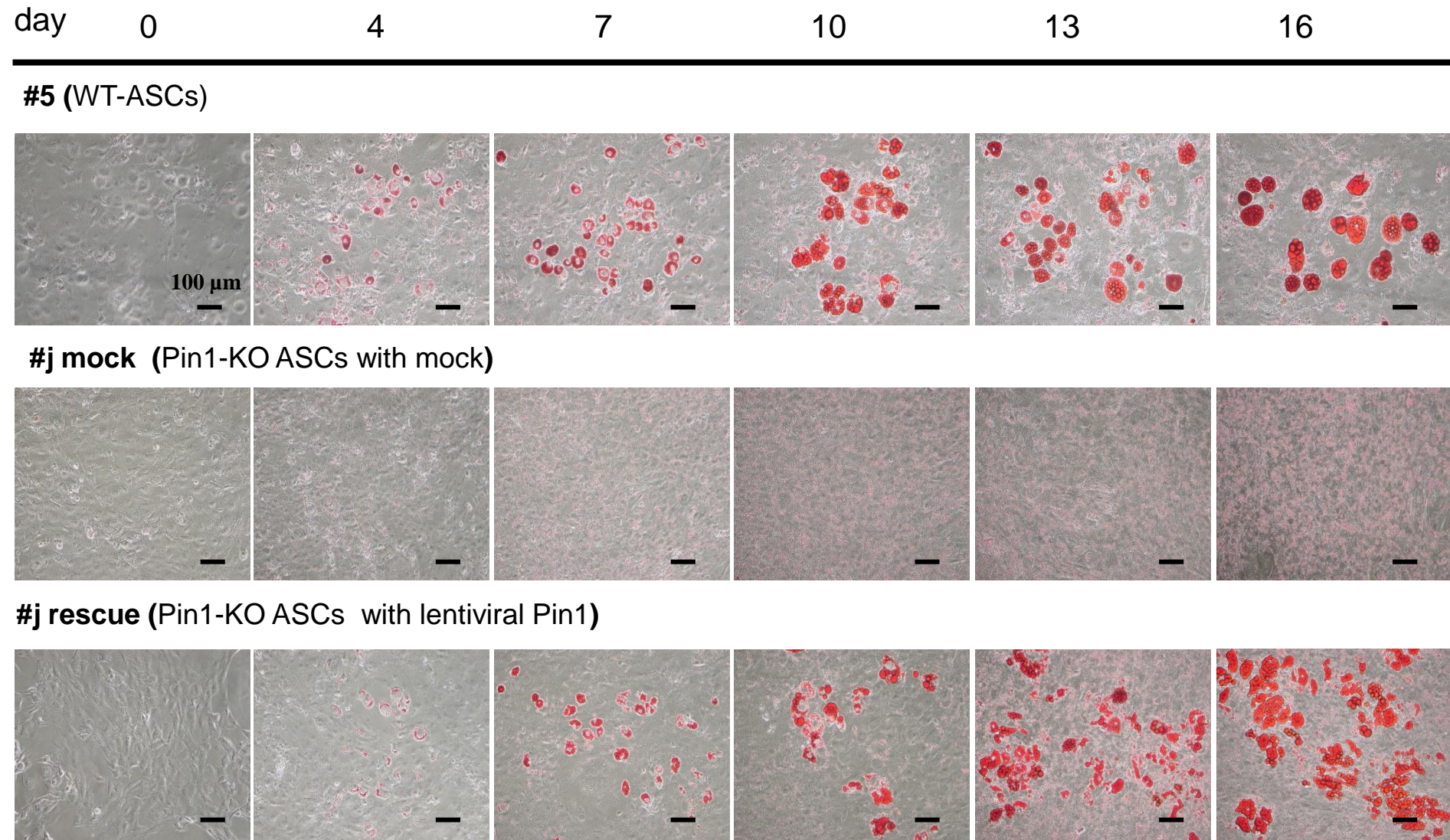
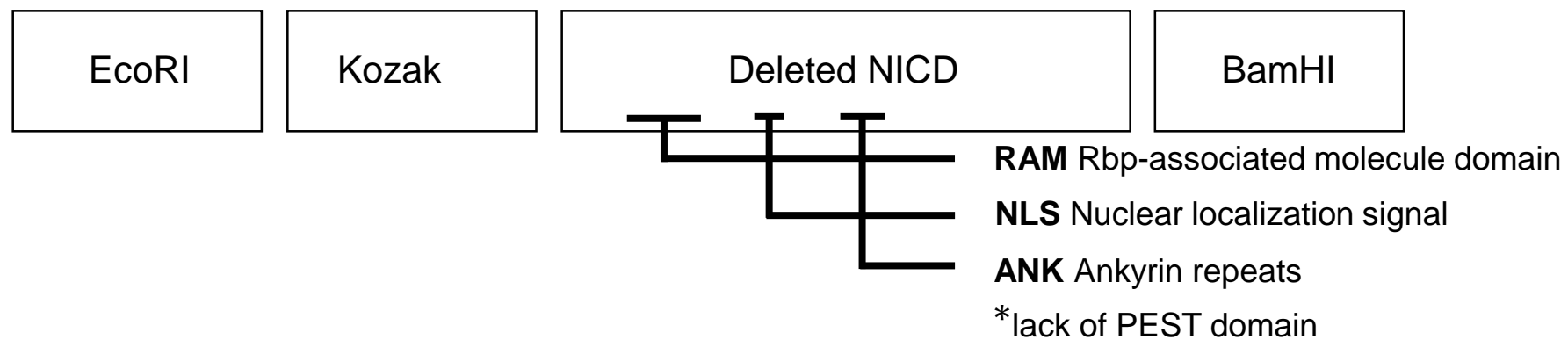


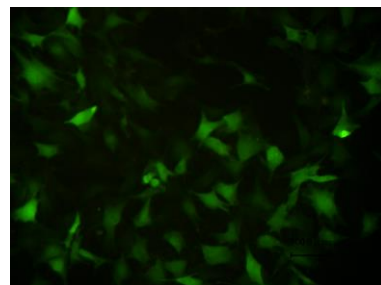
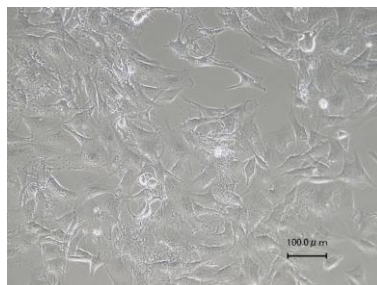
Fig.8 Comparison of ASCs differentiation to adipocytes. Comparison of adipocyte differentiation between the WT (Pin1^{+/+}; p53^{-/-}) ASCs and Pin1-KO (Pin1^{-/-}; p53^{-/-}) ASCs, and Pin1-KO ASCs rescued with the lentiviral Pin1 cDNA. The images of the oil red O-stained cells on 0, 4, 7, 10, 13, and 16 days after treatment with the differentiation reagent are shown.

A



B

Day0 NICD



Day0 vector

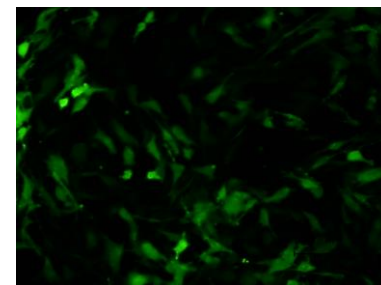
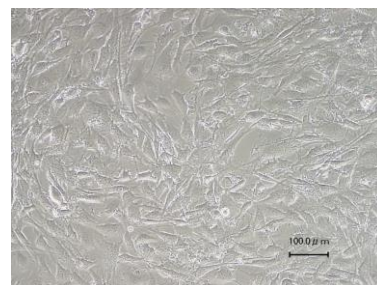


Fig.9 Transduction of ASCs by using lentiviral vector. (A) A structure of insert sequence transfected with the GFP-expression plasmid pCDHCMV-MCS-EF1-copGFP. (B) Representative bright field and fluorescence microscopy images of ASC cells after infection with lentiviral. Left panels: field images, right panels: GFP channel images (bar=100μm).

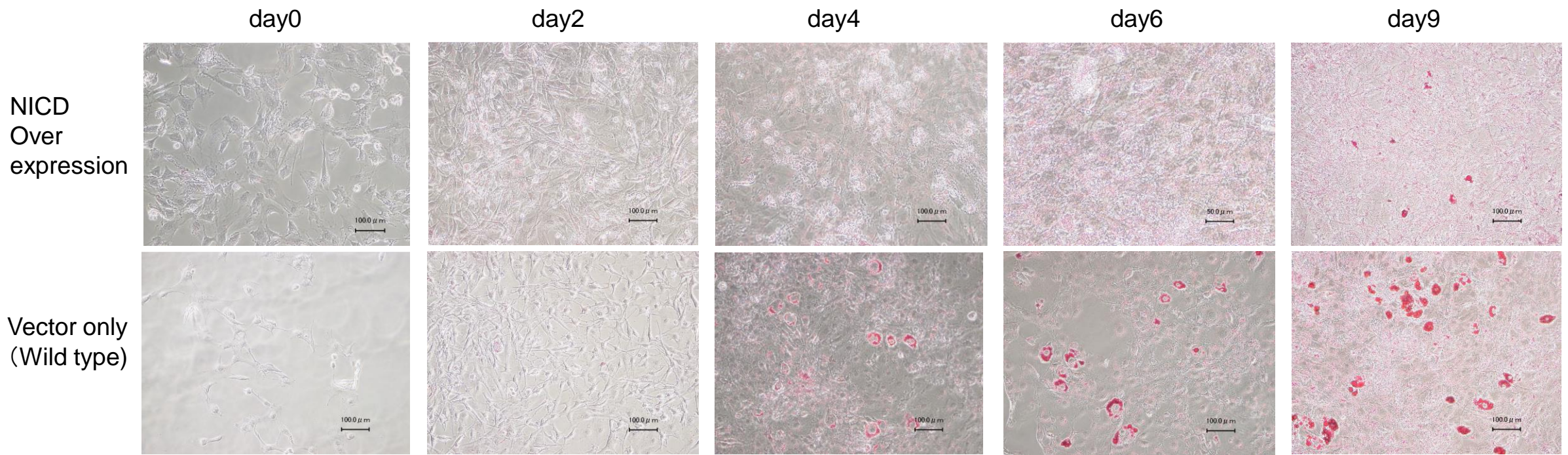


Fig.10 Comparison of ASCs differentiation to adipocytes. Comparison of adipocyte differentiation between the #5 ASCs infected lentivirus transfected vector only and deleted NICD overexpression with lentivirus in #5 ASCs.

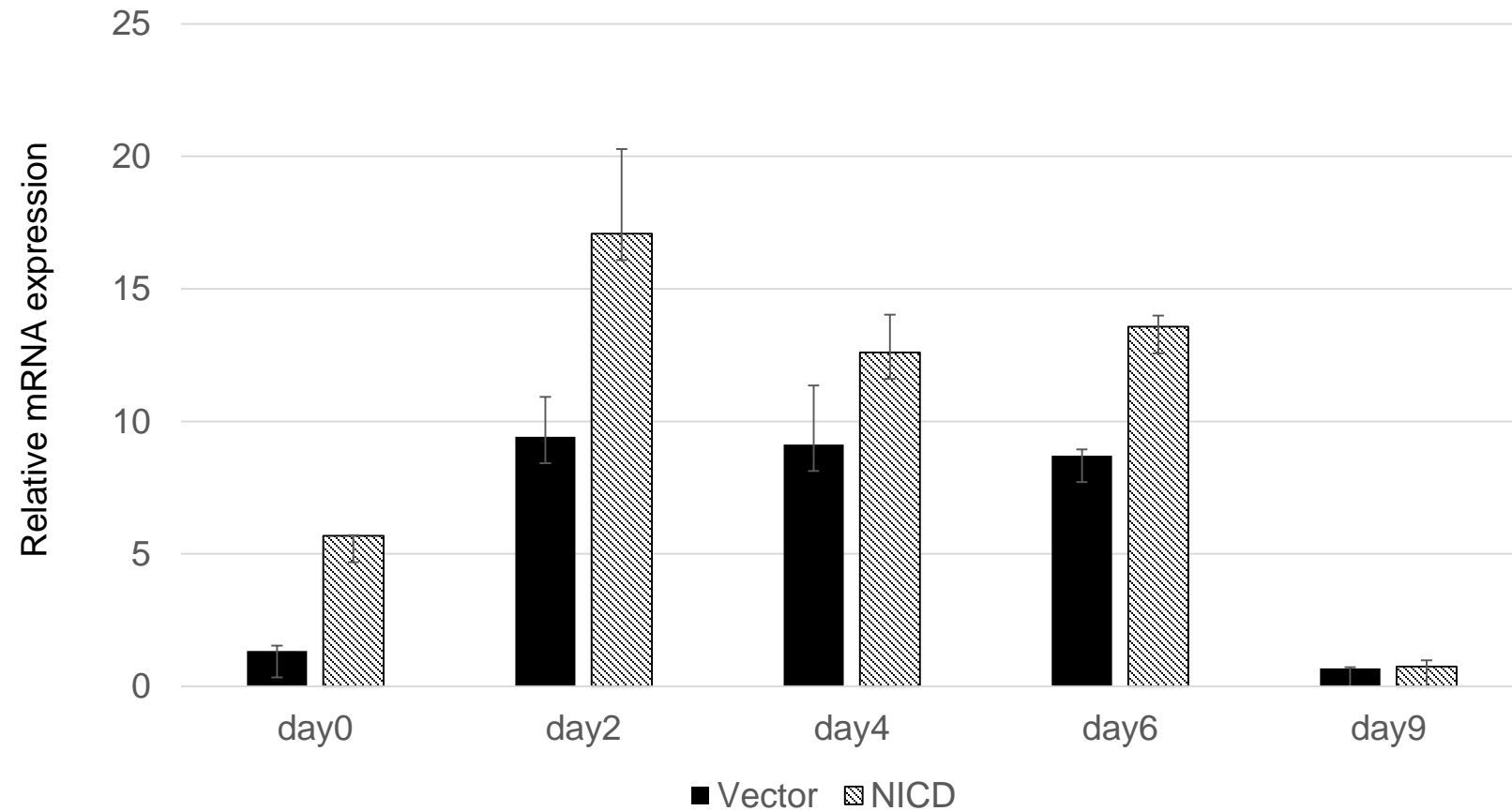


Fig.11 Relative mRNA expression of NICD gene in ASCs sample. The relative expression values are depicted as the mean \pm standard deviation of three biological replicates and correspond to the ratio between vector only(■) NICD overexpression (▨) for each day point.

Gene Name	Gene Symbol	Net intensity {Ratio}
inhibitor of DNA binding 2	Id2	0.46
aldehyde dehydrogenase family 6, subfamily A1	Aldh6a1	0.32
ERO1-like (S. cerevisiae) // ERO1-like (S. cerevisiae)	Ero1l // Ero1l	0.38
coiled-coil domain containing 85B // coiled-coil domain containing 85B	Ccdc85b // Ccdc85b	0.30
jagged 1	Jag1	0.47
transforming growth factor, beta 1	Tgfb1	0.46

Table.1 DNA Microarray: 2DOWN

謝辞

本研究を行うにあたり親身なご指導と激励を賜りました、東北大学大学院 農学研究科 分子酵素学分野 内田隆史教授に心から感謝の意を表します。

本博士論文の副査を担当してくださり、精子幹細胞における実験を進める上で研究に関する困難克服のための具体的な方策まで丁寧にご助言をいただきました 同大学 動物繁殖生物学分野 原健士朗准教授に厚く御礼申し上げます。

分子酵素学分野 日高將文助教授には、日頃より研究における多大なご協力を頂きました。深く感謝いたします。

脂肪由来間葉系幹細胞の脂肪細胞分化の基盤を築いてくださった分子酵素学分野 卒業生の皆様、研究活動を共に進めていただいた動物生殖科学分野 加茂祐樹さん、助け合いながら研究生活を共にした分子酵素学研究室の皆様に深く感謝いたします。

研究室の事務仕事をとりまとめてくださいました研究補助員の藤森富美子さんにお礼申し上げます。

最後に、大学院生活に理解を示してくれた家族、3 人の子供たち まりあ、龍生、莞爾に深い感謝の意を表し、謝辞といたします。

学位(博士)論文の内容に関連する公表論文

・ Suzuki A*, Saeki T, Ikuji H, Uchida C and Uchida T (2016) Brown Algae polyphenol, a prolyl isomerase Pin1 inhibitor, prevents obesity by inhibiting the differentiation of stem cells into adipocytes. PLOS One 11(12) e0168830 (査読有)

・ Suzuki A*, Kamo Y, Uchida C, Tanemura K, Hara K and Uchida T (2018) Prolyl isomerase Pin1 is required sperm production by promoting mitosis progression of spermatogonial stem cells. Biochem.Biophys.Res.Commun.497:388-393 (査読有)

参考文献

- [1] Takahashi K, Uchida C, Shin R-W, Shimazaki K and Uchida T. (2008) Prolyl isomerase, Pin1: new findings of post-translational modifications and physiological substrates in cancer, asthma and Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65(3):359-75.
- [2] Fujimori F, Takahashi K, Uchida C and Uchida T. (1999) Mice lacking Pin1 develop normally, but are defective in entering cell cycle from G (0) arrest. *Biochem Biophys Res Commun*. 265:658-663.
- [3] Yaffe MB, Schutkowski M, Shen M, Zhou XZ, Stukenberg PT, Rahfeid JU, Xu J, Kuang J, Kirschner MW, Fischer G, Cantley LC and Lu KP. (1997) Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science*. 278 (5345):1957-60.
- [4] Wulf G.M, Liou Y.-C, Ryo A, Lee S.W and Lu K.P. (2002) Role of Pin1 in the regulation of p53 stability and p21 transactivation, and cell cycle checkpoints in response to DNA damage. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(50):47976-9.
- [5] Zheng H, You H, Zhou X.Z and Murray S.A. (2002) The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response. *Nature*. 10:849-854.
- [6] Pulverer B. (2002) Pin-ning down p53 function. *Nat Cell Biol*. 4(11): E251.
- [7] Monje, P, Hernández-Losa J, Lyons R.J, Castellone M.D and Gutkind J.S. (2005) Regulation of the transcriptional activity of c-Fos by ERK. A novel role for the prolyl isomerase PIN1. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(42):35081-35084.
- [8] Wulf G.M, Ryo A, Wulf G.G, Lee S.W, Niu T, Petkova V and Lu K.P. (2001) Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. 20(13):3459-3472.
- [9] Lu PJ, Wulf G, Zhou XZ, Davies P and Lu KP. (1999) The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature*. 399:784-788.
- [10] Liou YC1, Sun A, Ryo A, Zhou XZ, Yu ZX, Huang HK, Uchida T, Bronson R, Bing G, Li X, Hunter T and Lu KP. (2003) Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration. *Nature*. 424:556-561.
- [11] Fujimori F1, Gunji W, Kikuchi J, Mogi T, Ohashi Y, Makino T, Oyama A, Okuhara K, Uchida T and Murakami Y. (2001) Crosstalk of prolyl isomerases, Pin1/Ess1, and cyclophilin A. *Biochem Biophys Res Commun*. 23;289(1):181-90.

- [12] Uchida T, Takamiya M, Takahashi M, Miyashita H, Ikeda H, Terada T, Matsuo Y, Shirouzu M, Yokoyama S, Fujimori F and Hunter T. (2003) Pin1 and Par14 peptidyl prolyl isomerase inhibitors block cell proliferation. *Chem Biol.* 10(1):15-24.
- [13] Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H and Ryo A. (2011) A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *The Journal of Biological Chemistry.* 286(13):11593-11603.
- [14] Liou YC1, Ryo A, Huang HK, Lu PJ, Bronson R, Fujimori F, Uchida T, Hunter T and Lu KP. (2002) Loss of Pin1 function in the mouse causes phenotypes resembling cyclin D1-null phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(3):1335-40.
- [15] de Rooij DG and Russell LD. (2000) All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl.* 21 (6):776-798
- [16] Russell et al. (1990) Evaluation of the testis 1990 *Textbook*
- [17] Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, Parvinen M, de Rooij DG, HessMW, Raatikainen-Ahokas A, Rauvala H, Lakso M, Pichel JG, Westpha H, Saarma M, Sariola H. (2000) Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science.* 287(5457):1489-1493.
- [18] Meng X, Lindahl M, Hyvönen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M, Pichel JG, Westphal H, Saarma M and Sariola H. (2000) Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science.* 25;287 (5457):1489-1493.
- [19] Kanatsu-Shinohara M and Shinohara T. (2013) Spermatogonial stem cell self-renewal and development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 29:163-187.
- [20] Yoshida S. (2012) Elucidating the identity and behavior of spermatogenic stem cells in the mouse testis. *Reproduction.* 144(3):293-302.
- [21] Hofmann MC, Braydich-Stolle L and Dym M. (2005) Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Dev Biol.* 279(1):114-124.
- [22] Hara K, Nakagawa T, Enomoto H, Suzuk M, Yamamoto M, Simons BD and Yoshida S. (2014) Mouse soermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states. *Cell Stem Cell* 14 658-672.
- [23] Hofmann MC1, Braydich-Stolle L and Dym M. (2005) Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Dev Biol.* 279:114-124.
- [24] Yoshida S. (2014) Elucidating the identity and behavior of spermatogenic stem cells in the mouse

testis. *Reproduction*. 144:293-302.

[25] Atchison FW and Means AR. (2003) Spermatogonial depletion in adult Pin1-deficient mice. *Biol Reprod* 69(6) 1989-1997.

[26] Zacchi P, Gostiss M, Uchida T, Salvagno C, Avolio F, Volinia S, Ronai Z, Blandino G, Schneider C and Del Sal G. (2002) The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults. *Nature*. 419:853-857.

[27] Zheng H, You H, Zhou XZ, Murray SA, Uchida T, Wulf G, Gu L, Tang X, Lu KP and Xiao ZX. (2002) The Prolyl isomerase Pin1 is a novel regulator of p53 in genotoxic response. *Nature*. 419 :849-853.

[28] Takahashi K, Akiyama H, Shimazaki K, Uchida C, Akiyama OH, Tomita M, Fukumoto M and Uchida T. (2007) Ablation of a peptidyl prolyl isomerase Pin1 from p53-null mice accelerated thymic hyperplasia by increasing the level of the intracellular form of Notch1. *Oncogene*. 26:3835-3845.

[29] Yeh E, Cunningham M, Arnold H, Chasse D, Monteith T, Ivaldi G, Hahn WC, Stukenberg T, Shenolikar S, Uchida T, Counter CM, Nevins JR, Means AR and Sears R. (2004) A signaling pathway controlling myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nature Cell Biol*. 6(4):308-318.

[30] *Nat Genet*. 2004 Jun;36(6):647-52. Epub 2004 May 23.

Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal.

Buaas FW1, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD, de Rooij DG, Braun RE.

[31] *Nat Genet*. 2004 Jun;36(6):653-9. Epub 2004 May 23.

Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells.

Costoya JA1, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, Orwig KE, Wolgemuth DJ, Pandolfi PP.

[32] Ueda J, Harada A, Urahama T, Machida S, Maehara K, Hada M, Makino Y, Nogami J, Horikoshi N, Osakabe A, Taguchi H, Tanaka H, Tachiwana H, Yao T, Yamada M, Iwamoto T, Isotani A, Ikawa M, Tachibana T, Okada Y, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H and Yamagata K. (2017)

Testis-Specific Histone Variant H3t Gene Is Essential for Entry into Spermatogenesis. *Cell Rep*. 18(3):593-600.

[33] Atchison FW, Capel B and Means AR. (2003) Pin1 regulates the timing of mammalian primordial germ cell proliferation. *Development*. 130:3579-3586.

[34] Ikami K, Tokue M, Sugimoto R, Noda C, Kobayashi S, Hara K and Yoshida S. (2015) Hierarchical

differentiation competence in response to retinoic acid ensures stem cell maintenance during mouse spermatogenesis. *Development*. 142(9):1582-1592.

[35] Gely-Pernot A1, Raverdeau M, Célèbi C, Dennefeld C, Feret B, Klopfenstein M, Yoshida S, Ghyselinck NB and Mark M. (2012) Spermatogonia differentiation requires retinoic acid receptor γ . *Endocrinology*. 153(1):438-449.

[36] Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiyaama A, Zhang J, Ono H, Fujishiro M, Kikuchi T, Fukushima T, Yoneda M, Ohno H, Horike N, Kanna M, Tsuchiya Y, Kamata H, Nishimura F, Isobe T, Ogihara T, Katagiri H, Oka Y, Takahashi S, Kurihara H, Uchida T and Asano T. (2011) Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1 associates with IRS-1 and enhances insulin actions and adipogenesis. *J. Biol. Chem*. 286: 20812-20822.

[37] Nakatsu Y, Otani Y, Sakoda H, Zhang J, Guo Y, Okubo H, Kushiyaama A, Fujishiro M, Kikuchi T, Fukushima T, Ohno H, Tsuchiya Y, Kamata H, Nagamachi A, Inaba T, Nishimura F, Katagiri H, Takahashi S, Kurihara H, Uchida T and Asano T. (2012) Role of Pin1 in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis in a rodent model. *J. Biol. Chem*. 287: 44526-44535.

[38] Nakatsu Y, Iwashita M, Sakoda H, Ono H, Nagata K, Matsunaga Y, Fukushima T, Fujishiro M, Kushiyaama A, Kamata H, Takahashi S, Katagiri H, Honda H, Kiyonari H, Uchida T and Asano T. (2015) Prolyl isomerase Pin1 negatively regulates AMPK by associating with the CBS domain in the γ -subunit. *J. Biol. Chem*. 290: 24255-24266.

[39] Uchida T, Furumai K., Fukuda T, Akiyama H, Takezawa M, Asano T, Fujimori F and Uchida C. (2012) Prolyl Isomerase Pin1 Regulates Mouse Embryonic Fibroblast Differentiation into Adipose Cells. *PLoS ONE*. 7: e31823.

[40] Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiyaama A, Ono H, Fujishiro M, Horike N, Yoneda M, Ohno H, Tsuchiya Y, Kamata H, Tahara H, Isobe T, Nishimura F, Katagiri H, Oka Y, Fukushima T, Takahashi S, Kurihara H, Uchida T and Asano T. (2010) Pin1 associates with and induces translocation of CRTC2 to the cytosol, thereby suppressing CRE transcriptional activity. *J. Biol. Chem*. 285:33018-33027.

[41] Yamashita-Yotsu M, Kondo S, Segawa S, Lin YC, Toyohara H, Ito H, Konoki K, Cho Y and Uchida T. (2013) Isolation and structural determination of two novel phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome* Okanura, and their radical scavenging activities. *Mar Drugs*. 11:165-183.

[42] Mori T, Itami S, Yanagi T, Tatara Y, Takamiya M, Uchida T. (2009) Use of a Realtime Fluorescence Monitoring System for High-Throughput Screening for Prolyl Isomerase Inhibitors. *J. Biomol. Screen*.14:419-424.

- [43] Mori T, Hidaka M, Lin Y, Yoshizawa I, Okabe T, Egashira S, Kojima H, Nagano T, Koketsu M, Takashima M and Uchida T. (2011) A dual inhibitor against prolyl isomerase Pin1 and cyclophilin discovered by a novel real-time fluorescence detection method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 406:439-443.
- [44] Mori T, Hidaka M, Ikuji H, Yoshizawa I, Toyohara H, Okuda T, Uchida C, Asano T, Yotsu-Yamashita M and Uchida T. (2014) A high-throughput screen for inhibitors of the prolyl isomerase, Pin1, identifies a seaweed polyphenol that reduces adipose cell differentiation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78:832-838.
- [45] Komine A, Abe M, Saeki T, Terakawa T, Uchida C and Uchida T. (2012) Establishment of adipose-derived mesenchymal stem cell lines from a p53-knockout mouse. *Biochem Biophys Res Commun.* 5;426(4):468-74.
- [46] Barry F.P and Murphy J.M, (2004) Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 36:568-584.
- [47] Ross D.A, Rao P. K and Kadesch T. (2004) Dual Roles for the Notch Target Gene Hes-1 in the Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes. *Molecular and Cellular Biology.* 24(8):3505-3513.
- [48] Islam R, Yoon H, Kim B.S, Bae H.S, Shin H.R, Kim W.J, Yoon W.J, Lee Y.S, Woo K.M, Baek J.H and Ryoo H.M . (2017) Blood-testis barrier integrity depends on Pin1 expression in Sertoli cells. *Scientific Reports.* 7:6977.